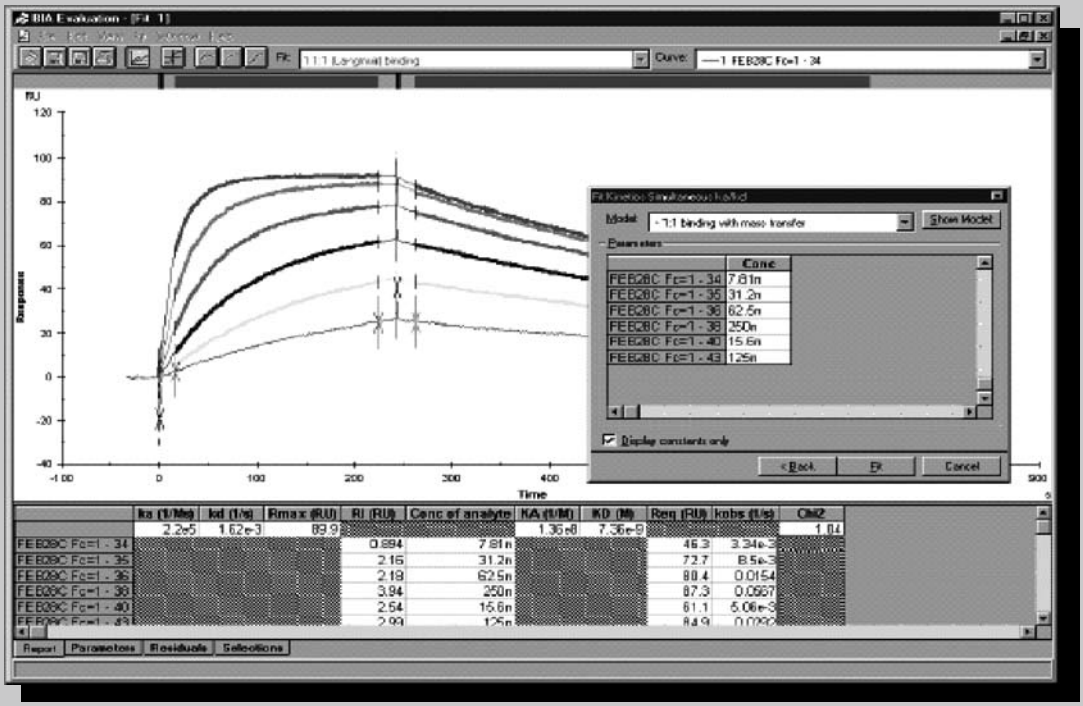
GE Healthcare

Biacore

BIAevaluation

Ver. 2.1

Instrument Handbook



日本語取扱説明書

GE imagination at work

71-3205-31

BIAevaluation Software Handbook

BIAevaluation は、目的のデータファイルを読み込み、目的の反応領域について重ね書きによる反応パターンの比較およびカーブフィッティングによる（結合および解離反応速度定数）の算定を行う Biacore 専用の解析ソフトウェアです。

このHandbookにおいては､比較的容易な計算操作の流れを説明してあります。各操作および計算方法の詳細については、BIAevaluation Software Handbook を参照することをおすすめします。

機能仕様

測定レンジ

濃度	10^{-3} － 10^{-11}M
アフィニティー（k_d/k_a）	10^{4} － 2×10^{12}M^{-1}
カイネティクス	
結合速度定数（k_a）	10^{3} － 10^{7}M^{-1}s^{-1}
解離速度定数（k_d）	5×10^{-6} － 10^{-1}s^{-1}

目次

1.センサーグラムの重ね書き

1－1　ソフトウェアの起動　1
1－2　ファイルの呼び出し　1
1－3　グラフ化　3
1－4　グラフの変形　4
①　不必要部分の削除　4
②　ベースラインのあわせ方　5
③　インジェクション・ポイントのあわせ方　6
④　一つの連続したセンサーグラムからの重ね書き　10
1－5　グラフの引き算　14
1－6　その他
①　グラフのタイトル　16
②　センサーグラムの凡例　17
③　センサーグラムの色、その他表示の変更　19
④　グラフの表示スケール　20

2.　反応速度定数の算出

2－1　非線形解析（Non-Linear Fitting）　21
①　グラフの重ね書き　21
②　反応様式の設定　23
③　解離速度定数（k_d）の算出　24
④　結合速度定数（k_a）の算出　28
2－2　線型解析（Linear Fitting）　33
①　グラフの重ね書き　33
②　反応様式の設定　33
③　反応速度定数の算出　34

3.　低アフィニティーの解離定数算出

3－1　解析モデルの設定　42
3－2　解析方法　43
①　コントロールを差し引いたグラフの重ね書き　43
②　Average の設定（平衡値 Req の算出）　45

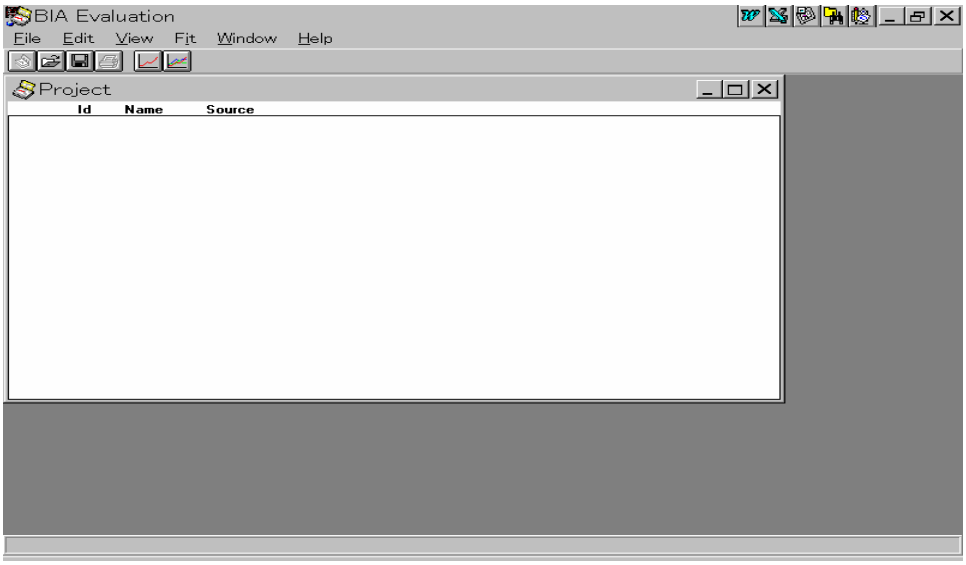
4. 濃度測定

4－1　濃度測定の実験　49
4－2　濃度測定解析　51
① ソフトウェアの起動　51
② ファイルの呼び出し　51
③ データの抽出　52
④ 検量線の作成　53
⑤ 未知濃度の算出　54
4－3　複数セル同時濃度測定　54
① プロトコール　54
② 解析方法　56

1.センサーグラムの重ね書き（Overlay plots）

1-1. ソフトウェアの起動

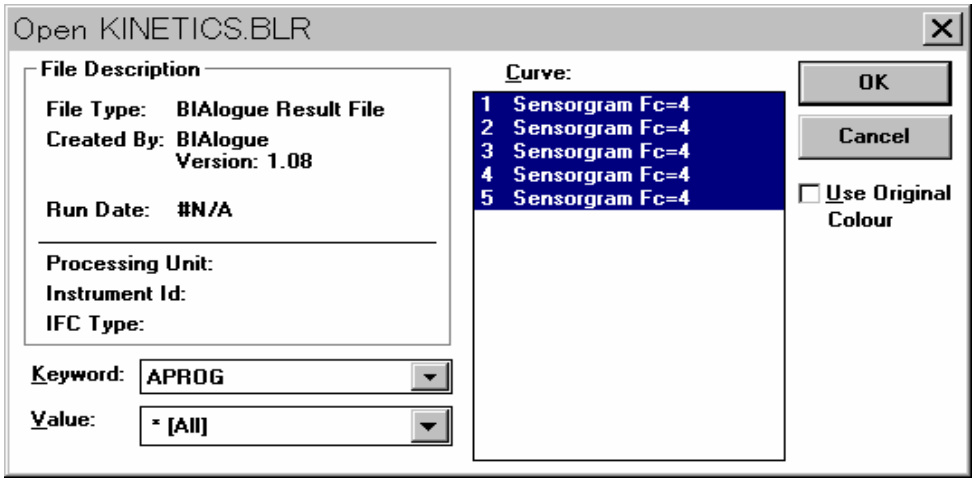
Biacore control software の画面上のアイコン（ ）もしくは画面左下の
Start → **BIAprogram** → **BIAevaluation　2.1**（あるいは **2.2**）をクリックします。



1-2. ファイルの呼び出し

アイコン（ ）をクリックし、目的のファイルを選択します。

OK をクリックします。



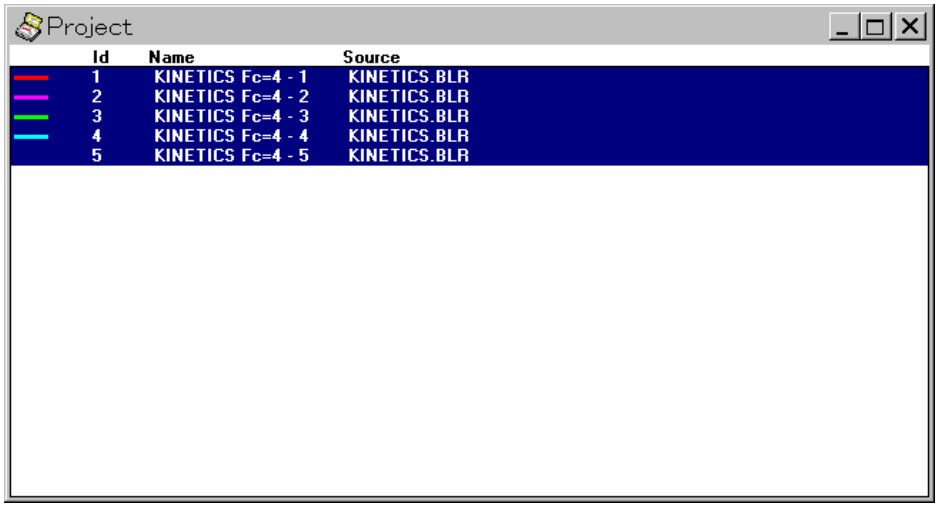
注意

Use Original Color をチェックすると、Biacore control software と同様に、各フローセルがオリジナル色で表示されます。

フローセル 1 ・・・・・・赤
フローセル 2 ・・・・・・緑
フローセル 3 ・・・・・・青
フローセル 4 ・・・・・・ピンク

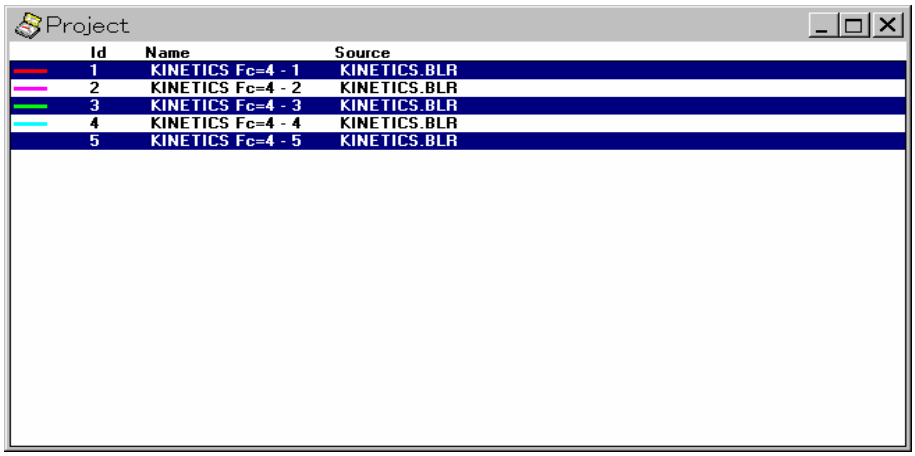
Use Original Color は、目的によって選択します。

OK をクリックします。


Project
Id Name Source
1 KINETICS Fc=4 - 1 KINETICS.BLR
2 KINETICS Fc=4 - 2 KINETICS.BLR
3 KINETICS Fc=4 - 3 KINETICS.BLR
4 KINETICS Fc=4 - 4 KINETICS.BLR
5 KINETICS Fc=4 - 5 KINETICS.BLR

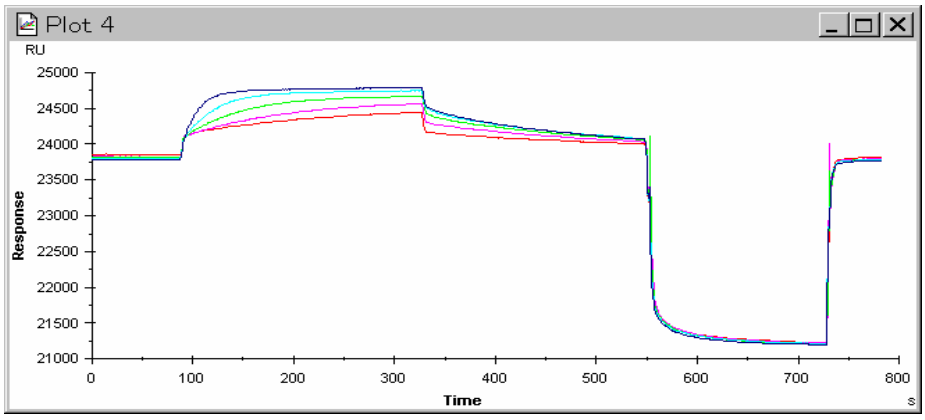
1-3. グラフ化

はじめの状態では全カーブが選択されています。
目的のカーブのみを選択したい場合には、カーソルを目的のカーブに移動後、クリックします。連続しないで選択したい場合には、コントロール・キー（Ctrl）を押しながらクリックします。

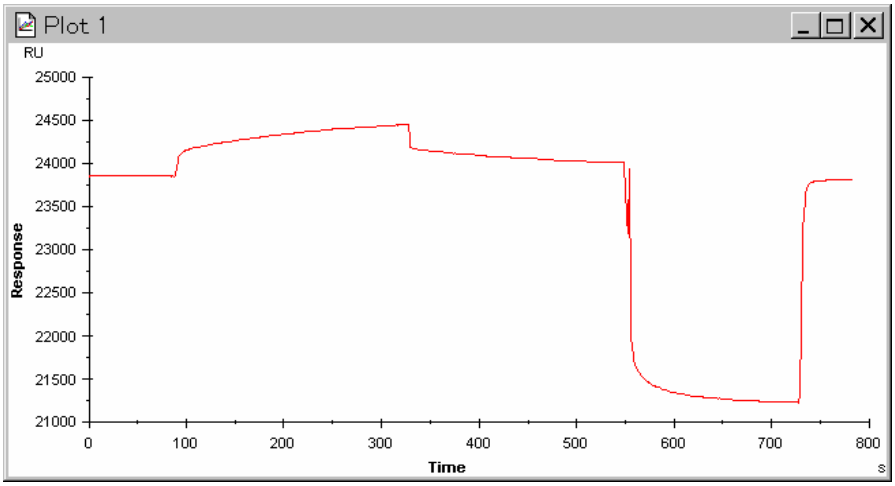


また、一番上のカーブを選択し、シフト・キー（Shift）を押しながら、最後のグラフをクリックすると、全カーブが選択されます。

アイコン（ ）をクリックすると選択したグラフが表示されます。



また、アイコン（ ）をクリックすると、カーブリストに表示されているカーブのみが、１本表示されます。



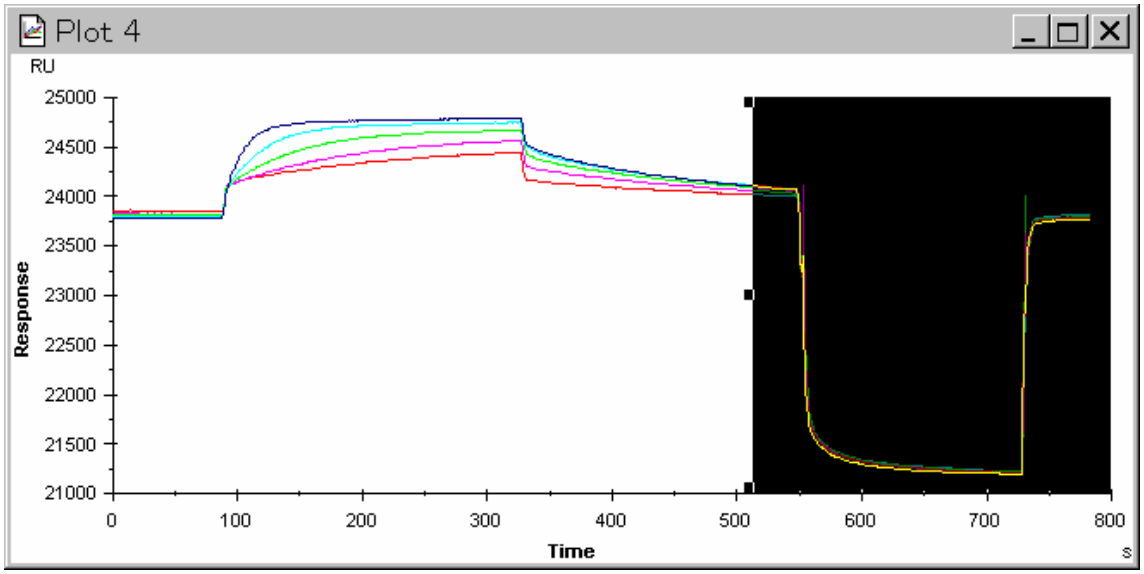
右上のカーブリスト Curve

のカーブを変更すると、グラフも変更できます。

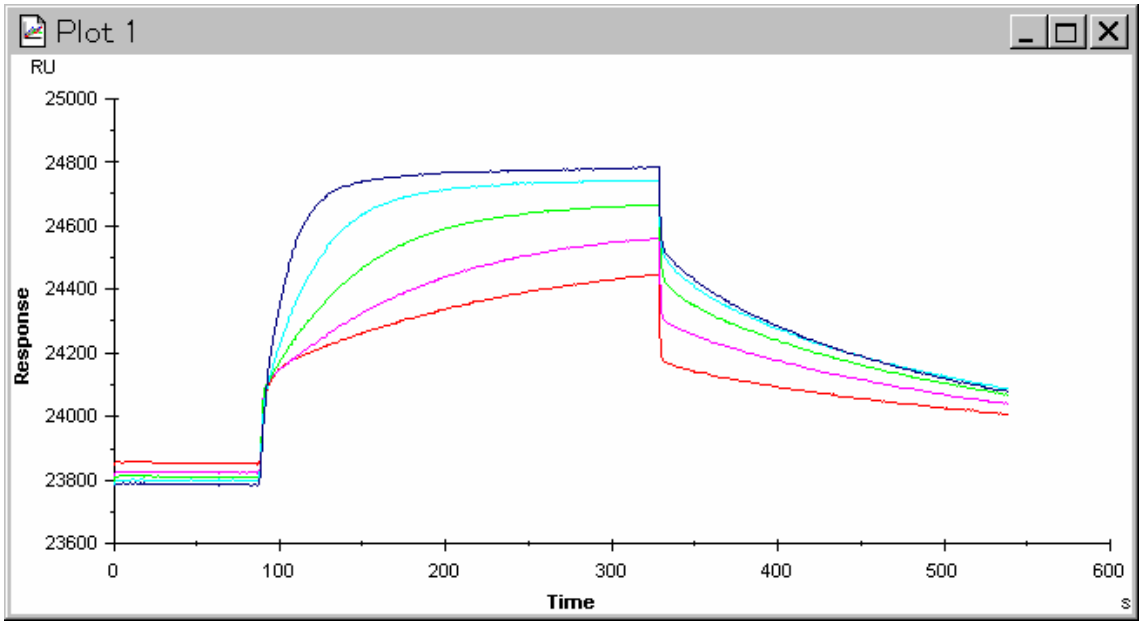
1-4. グラフの変形

①不必要部分の削除

センサーグラム中の不必要な部分（再生領域など）を削除します。
センサーグラムを重ね書きし、マウスの右のボタンをドラッグし、削除する範囲を設定します。

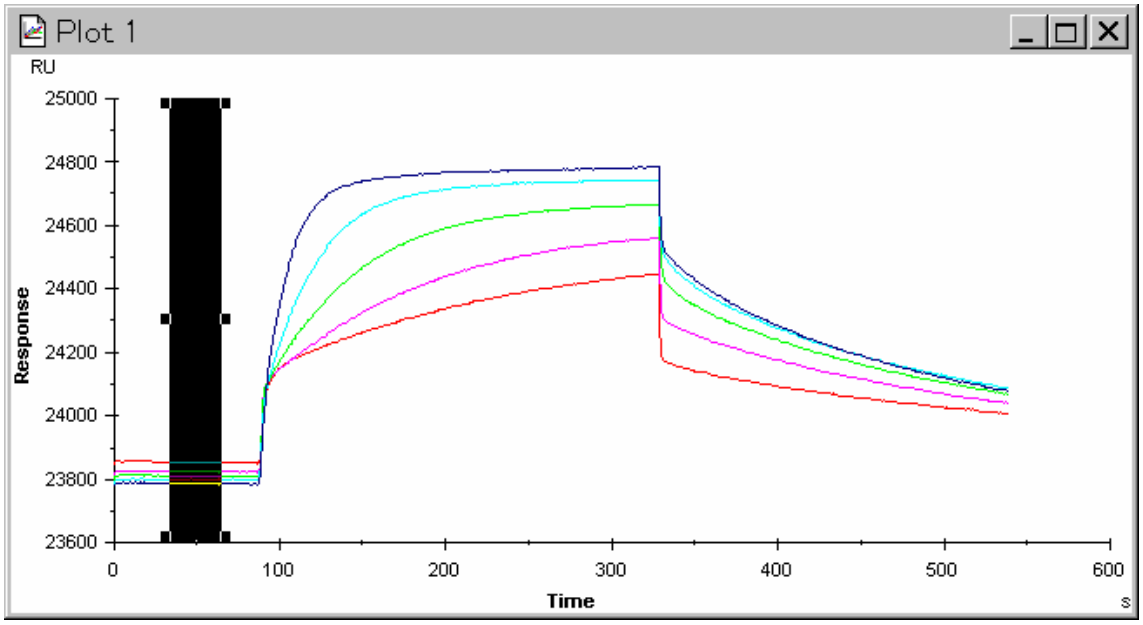


Edit → Cut をクリックします（キーボードのコントロール・キーを押しながらＸキーを押しても削除できます）。

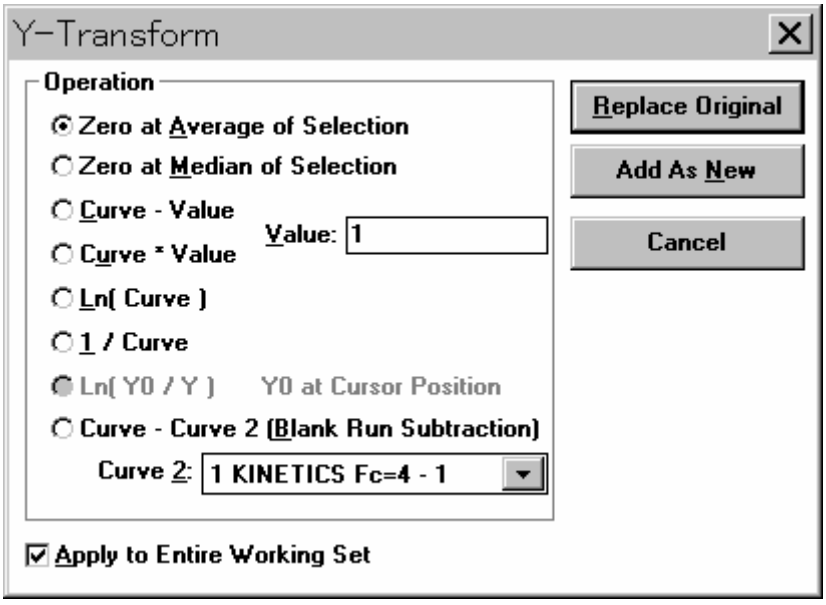


②ベースラインのあわせ方

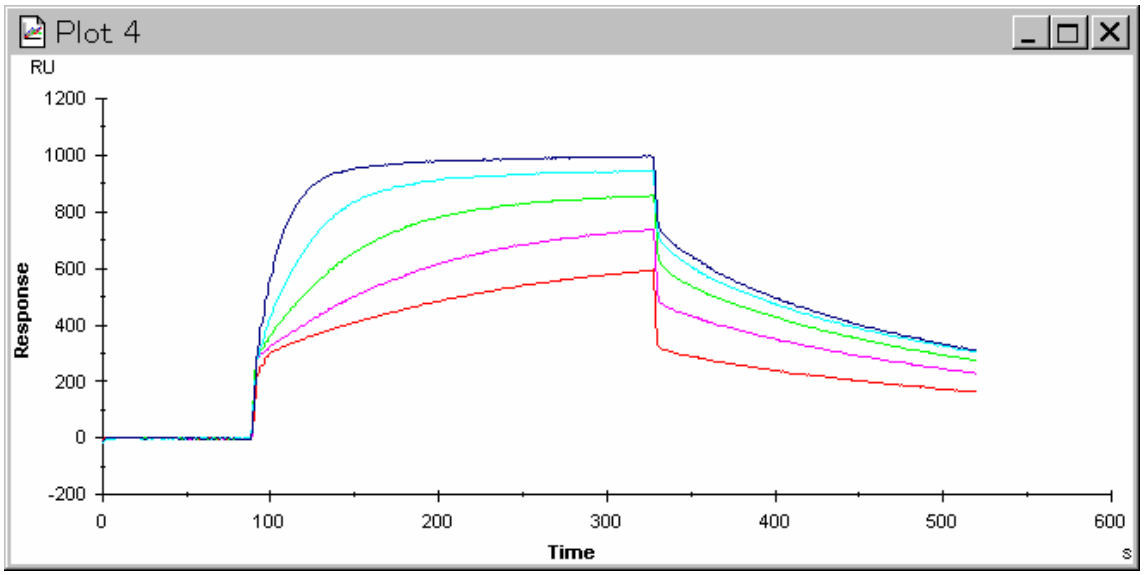
同様にマウスの右ボタンを使用し、ベースラインをあわせる範囲をドラッグします。



アイコン（ ）あるいは **Calculate → Y-Transform...**をクリックします。



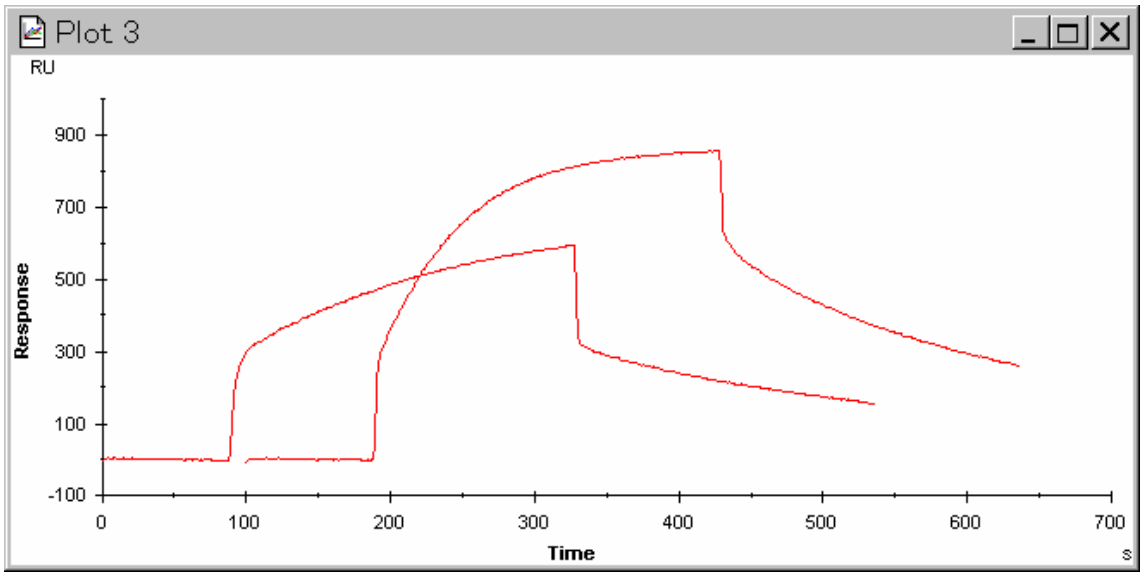
一番上の ○ **Zero at Average of Selection** を選択し、**Replace Original** をクリックします。



③インジェクション・ポイントのあわせ方

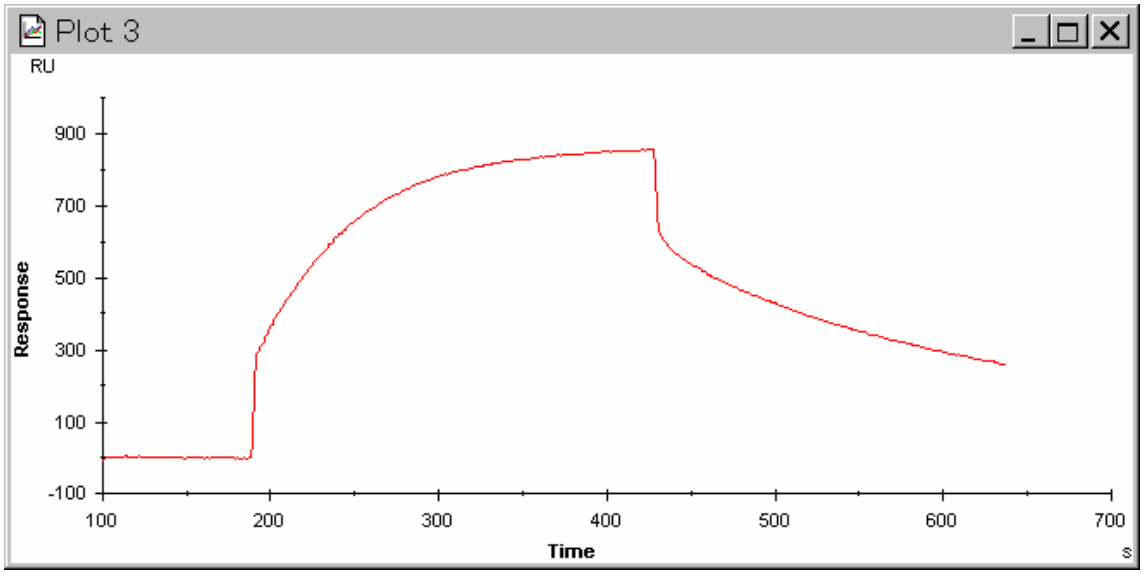
異なったプログラムで作成したデータやマニュアル操作で作成したデータを重ね書きする場合、インジェクション・ポイントの位置が異なってきます。

(例)

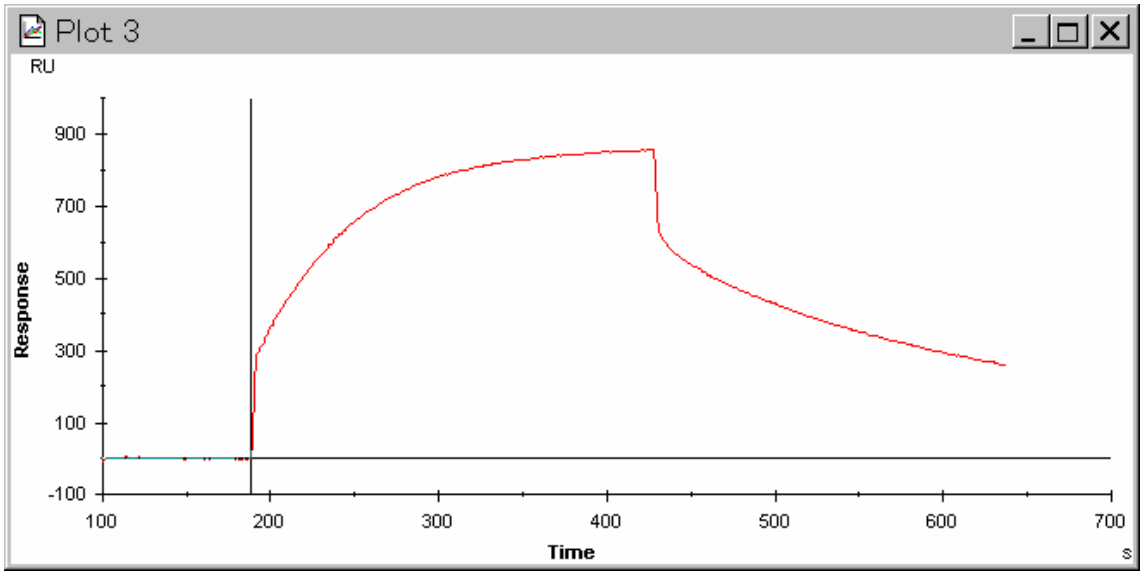


この場合には、X軸移動をして、インジェクション・ポイントをあわせる必要があります。それぞれのグラフを一本表示します（Single/Overlay Plot をクリック）。

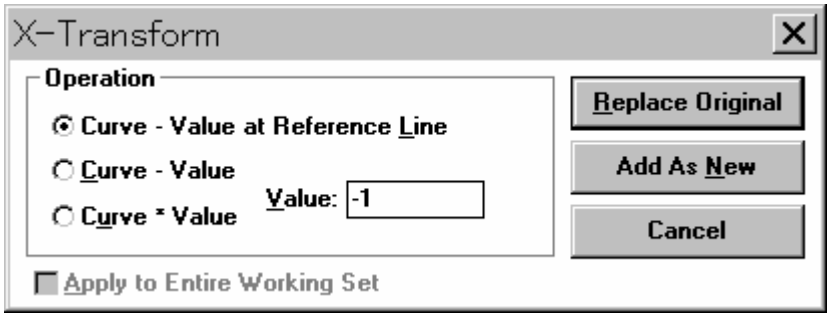
アイコン（ ）をクリックします（ここで表示されているセンサーグラムは、カーブリスト中のカーブです）。



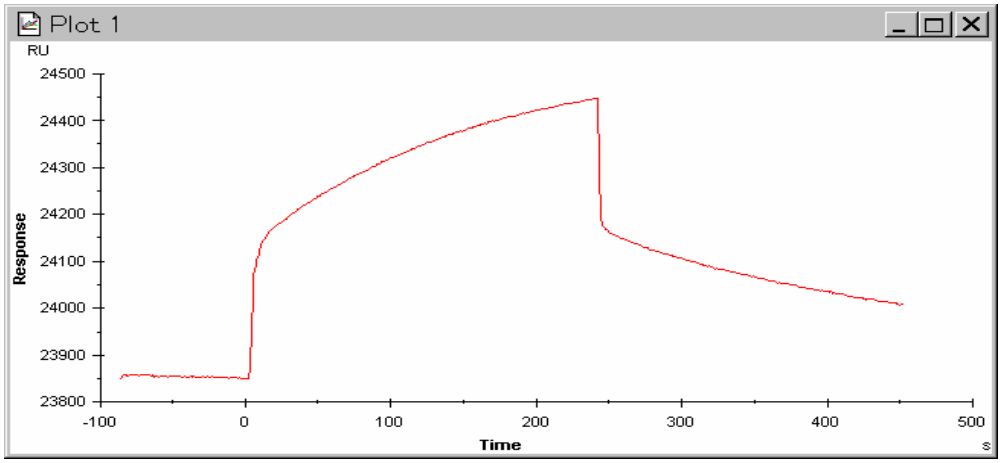
アイコン（ ）をクリックし、**リファレンスライン**を表示し、インジェクション・ポイントにあわせます。



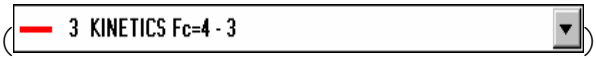
アイコン（ ）あるいは **Calculate X-Transform...**をクリックします。



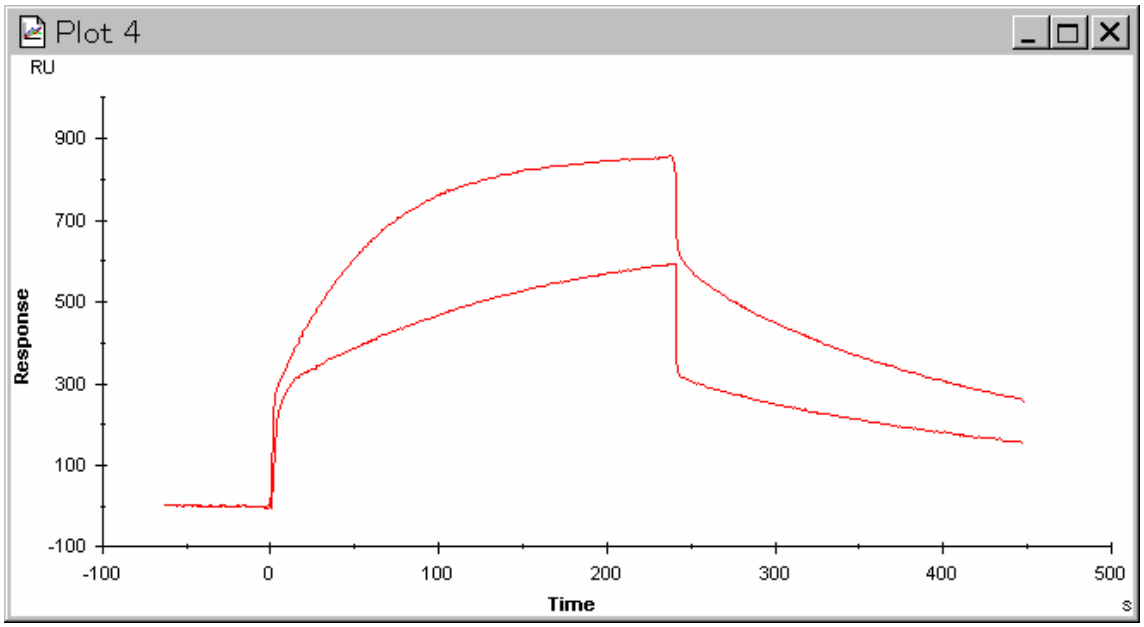
一番上の **Curve - Value at Reference Line** を選択し、**Replace Original** をクリックします。



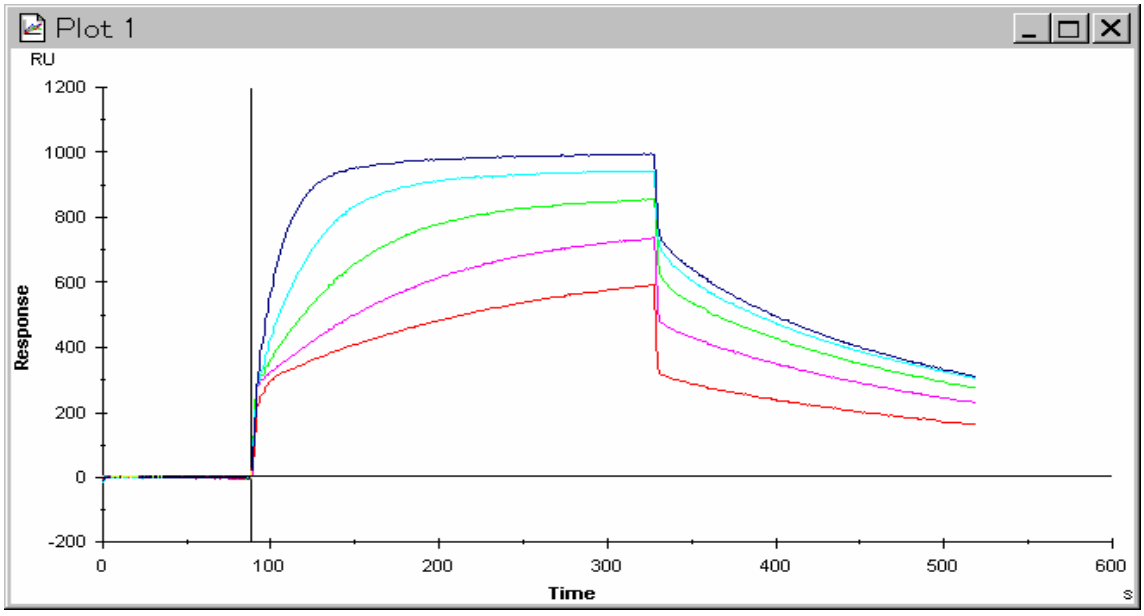
インジェクション・ポイントが 0 秒になります。

カーブリスト（ 

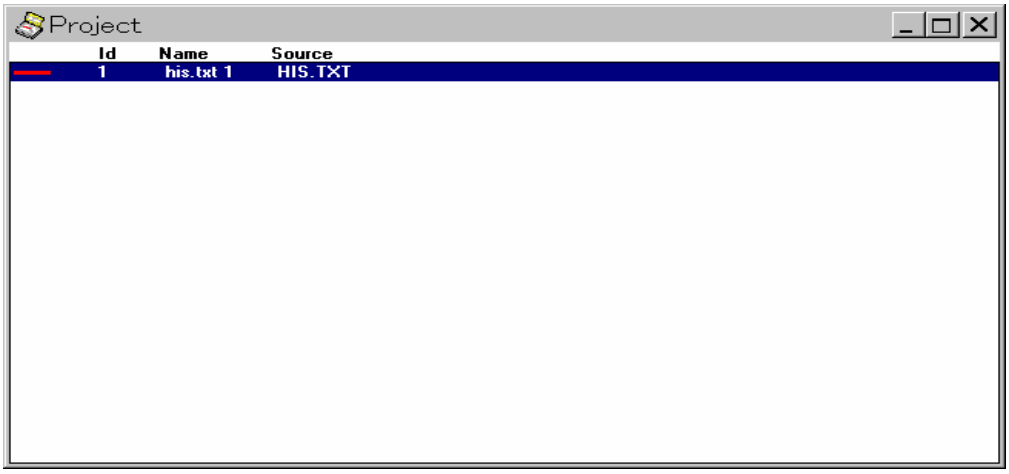
）で別のカーブを選択しセンサーグラムを表示させ、同様にX軸移動を行い、インジェクション・ポイントを揃えます。
揃えたセンサーグラムを重ね書きします。



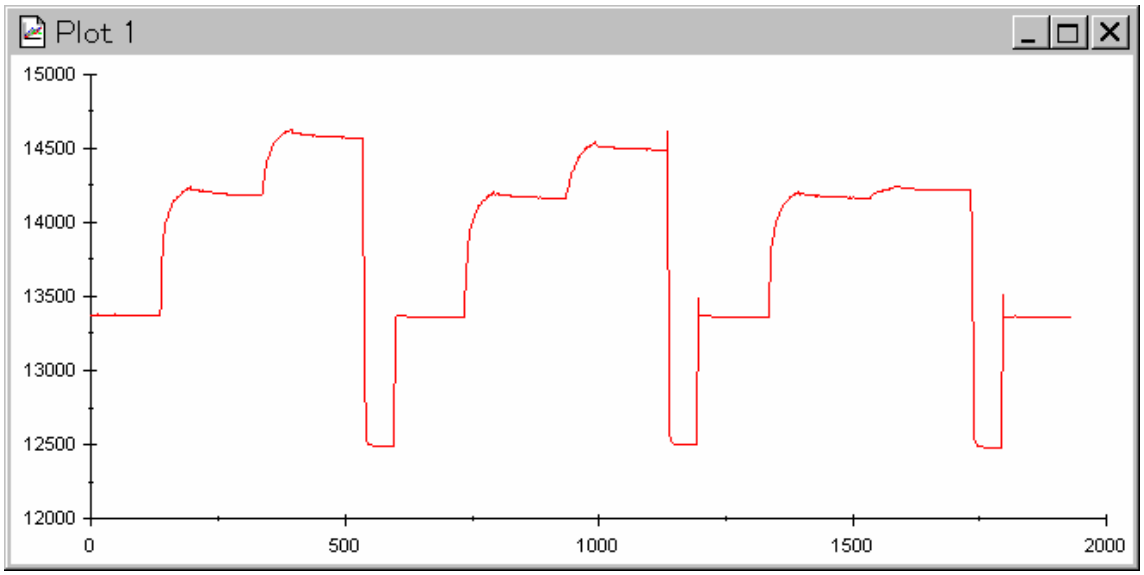
この操作は、インジェクション・ポイントが揃っていて0秒に移動したい場合も、重ね書きした状態でまとめて行うこともできます。



④1 つの連続したセンサーグラムからの重ね書き
ファイル（his.txt）を呼び出します。

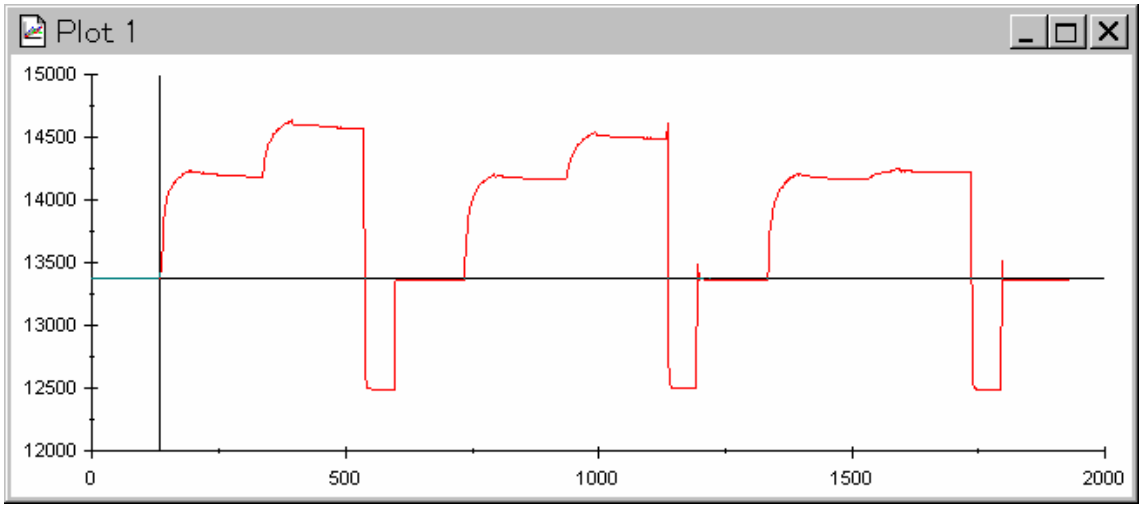


シングルプロットのアイコン（ ）をクリックします。

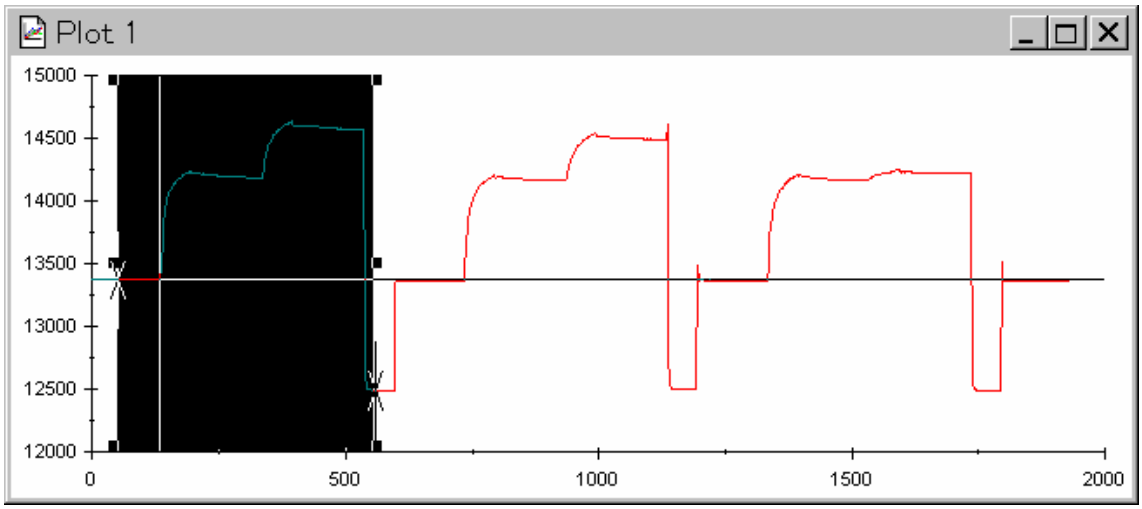


このセンサーグラムでは、３回の測定を１つの連続したセンサーグラムで行っています。それぞれのセンサーグラムの重ね書きしたい部分をコピー・ペーストして３枚のセンサーグラムにわけてから、重ね書きを行います。

１つ目の部分をコピー・ペーストします。
リファレンスライン（ ）を呼び出し、インジェクション・ポイントにあわせます。

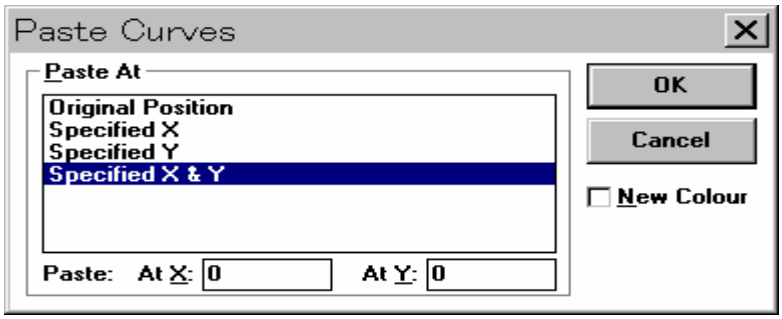


コピーする範囲をマウス右のボタンをドラッグし指定します。

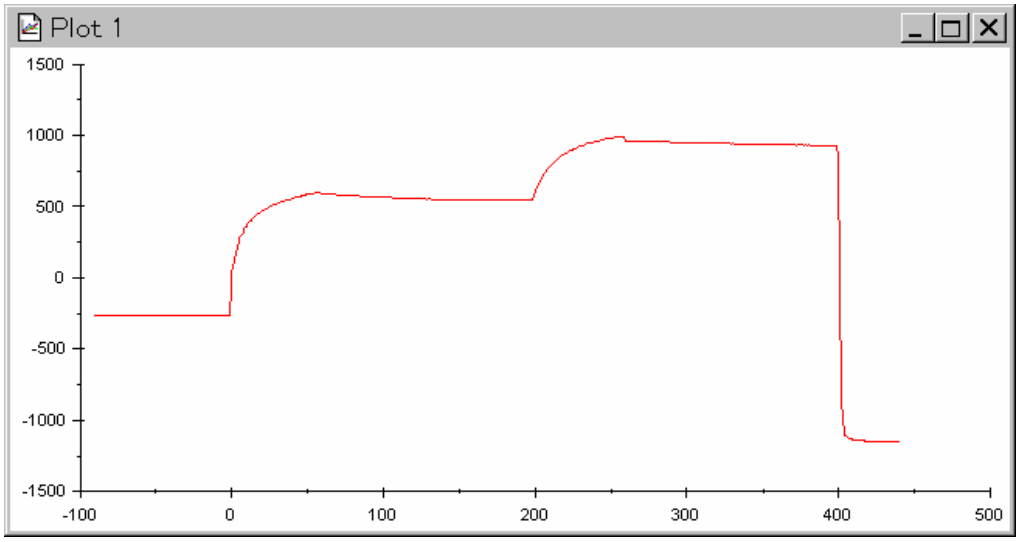


Edit → **Copy**（注：Copy　Graph ではありません）をクリックします。

Edit → **Paste Curve** をクリックします。

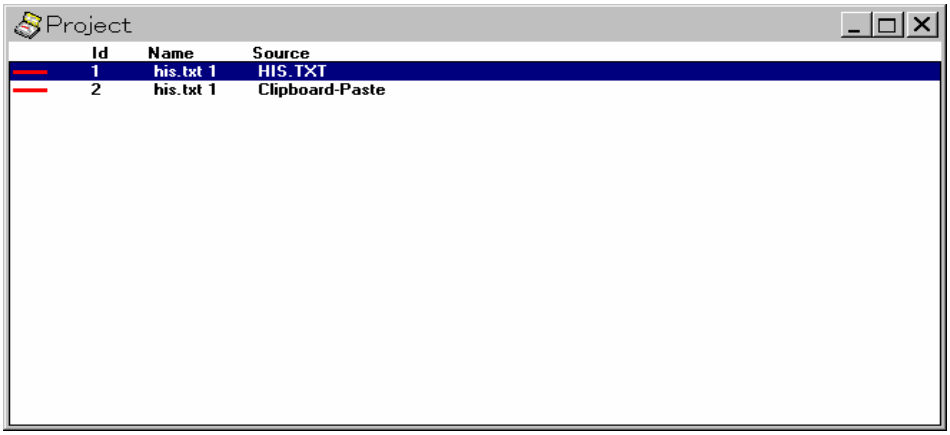


Specified　X & Y を選択し、**OK** をクリックします。

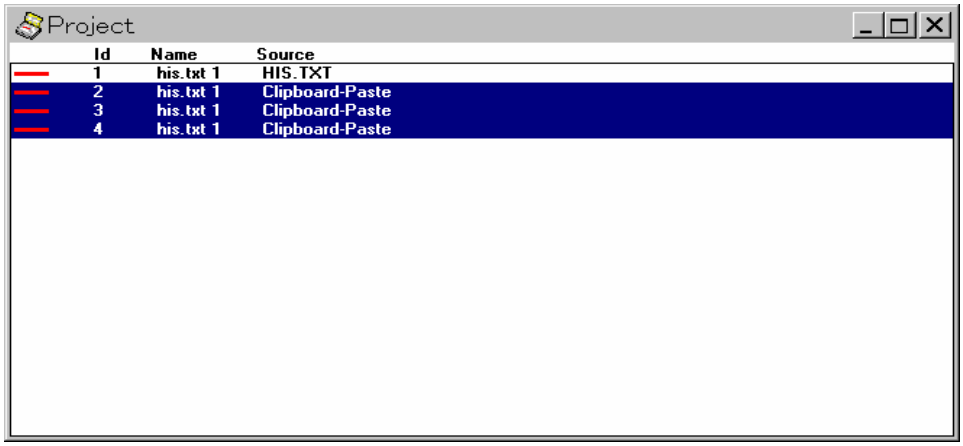


リファレンスラインをセットした位置のＸ軸およびＹ軸の値が 0 になり、選択された範囲でペーストされます。ペーストしたセンサーグラムは保存されていますので、**File → Close** してもかまいません。

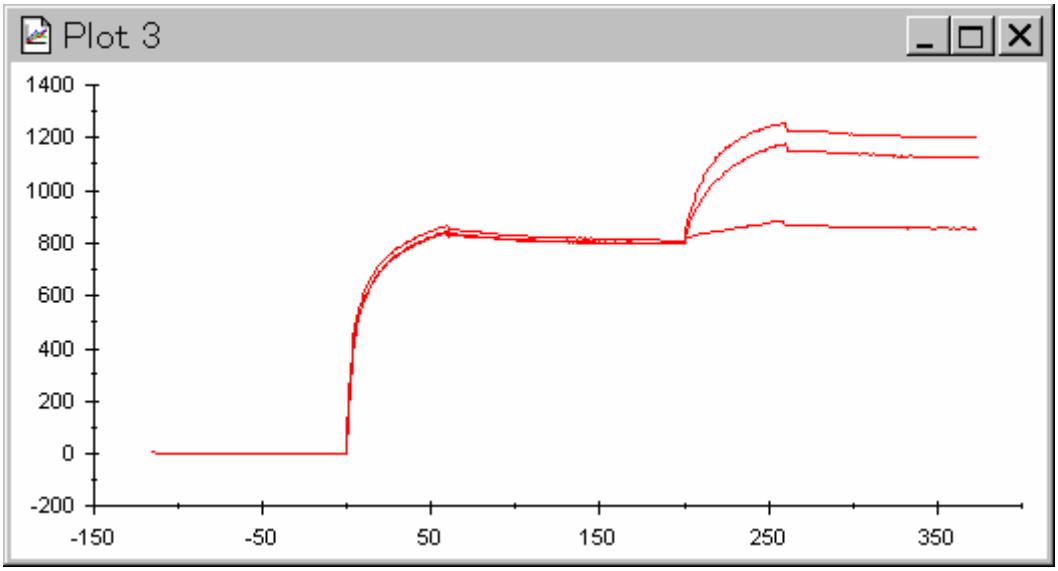
プロジェクト(**Window → Project**)に戻るとペーストしたセンサーグラムが 1 個追加されます。



もう一度、最初のセンサーグラムを表示させ、２個目、３個目の範囲を設定して、同様にコピー・ペーストしていきます。

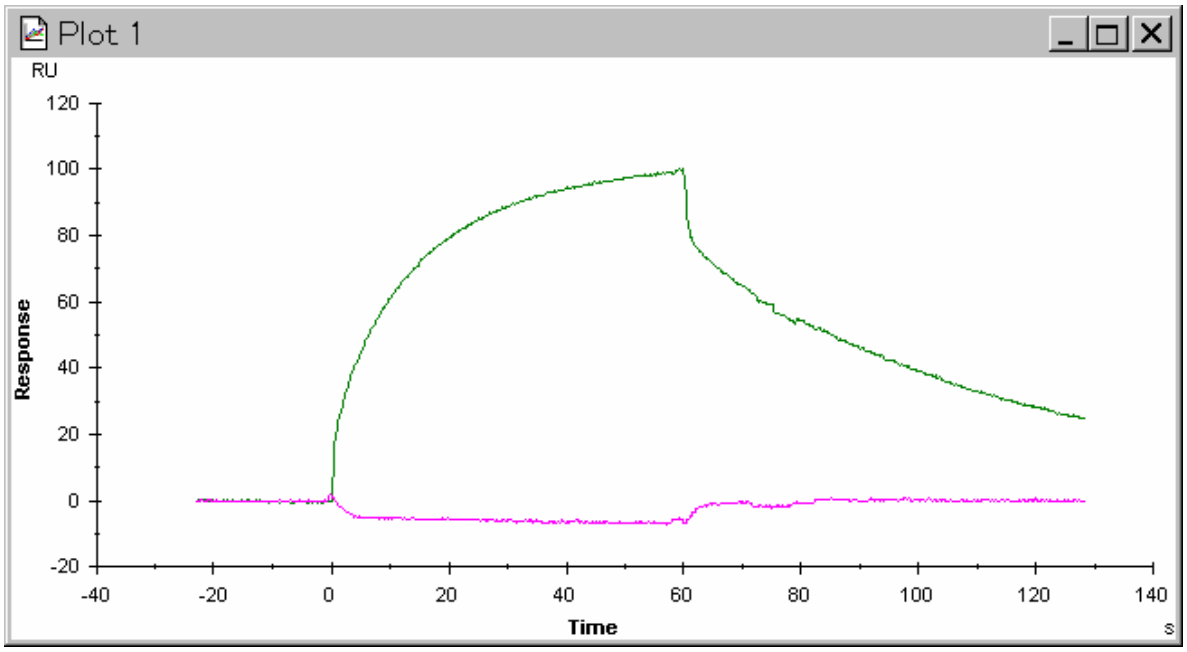


ペーストしたセンサーグラムを３枚選択し、重ね書きします。
さらに、不要な部分を削除し、ベースラインをあわせます。

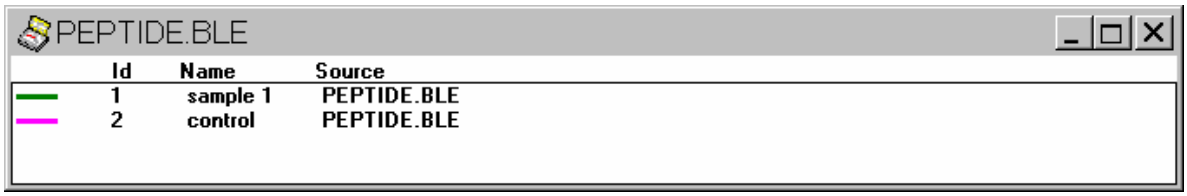


1-5. グラフの引き算

コントロールの差し引きなど、グラフの差し引きは以下の方法で行います。

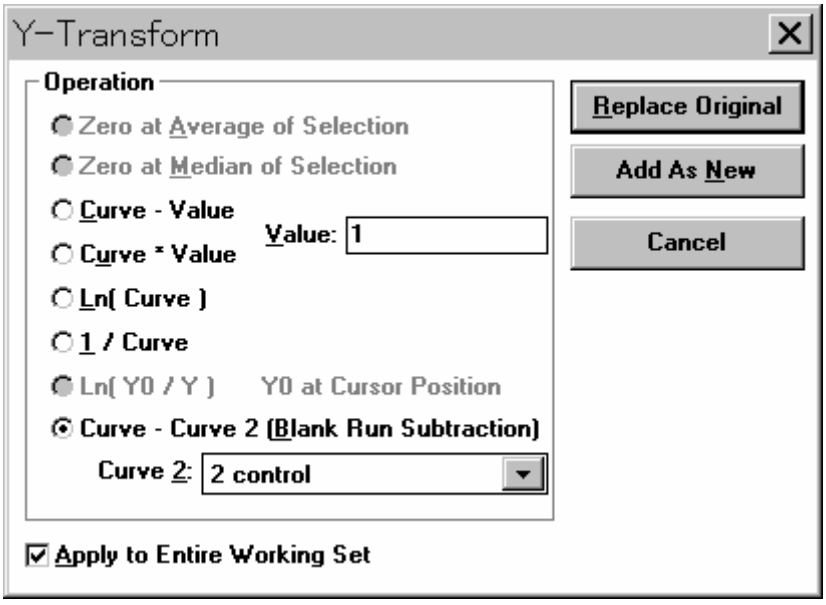


上記のようなグラフでは、相互作用したセンサーグラムとコントロールの重ね書きが示されています。



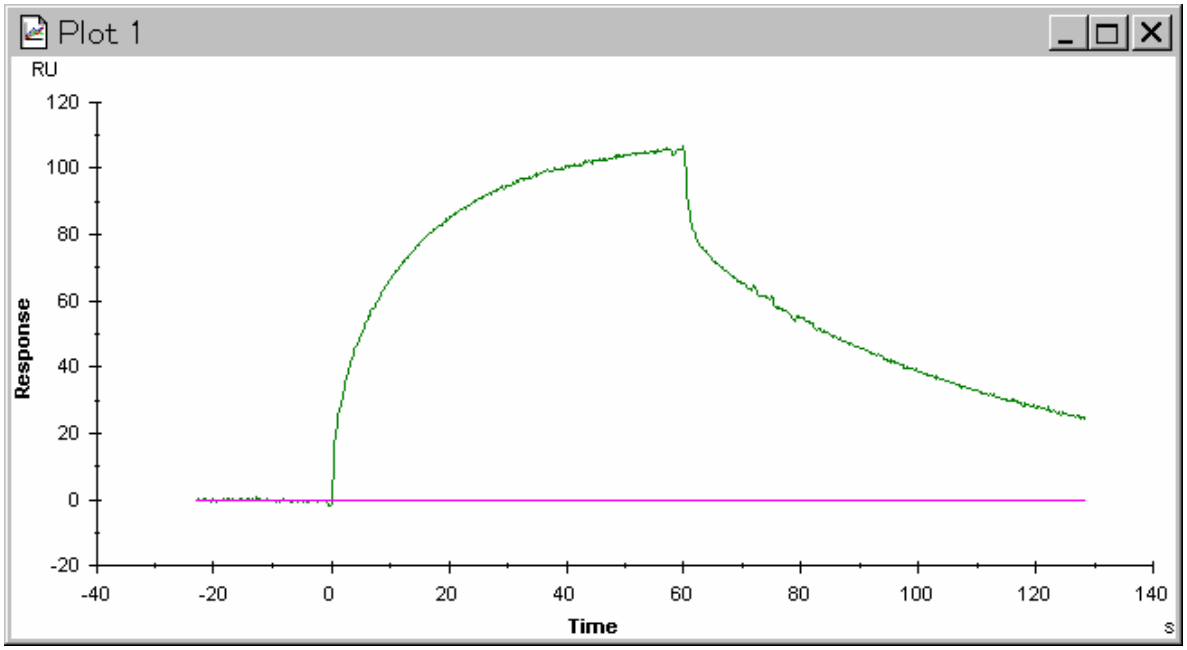
1 から 2 を引き算します。

アイコン（ ）をクリックします。



○Curve - Curve 2 (Blank Run Subtraction)を選択します。
Curve 2 で引くグラフを選択します。
ここでは、コントロールである 2 control を選択します。

Replace Original (表示しているグラフを変形)あるいは Add As New(新しいグラフを作成)をクリックします。



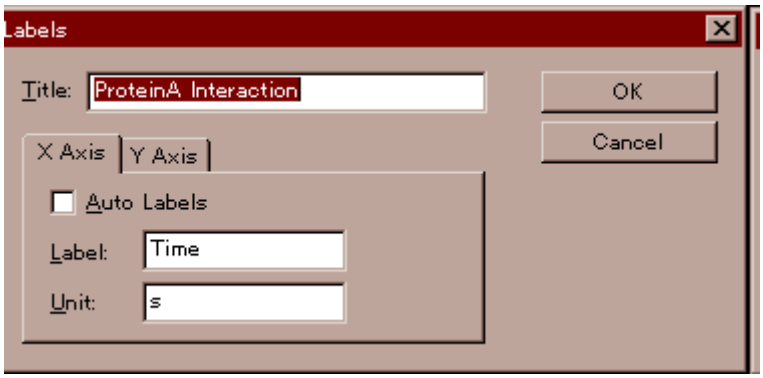
引き算されたグラフが表示されます。

1-6. その他

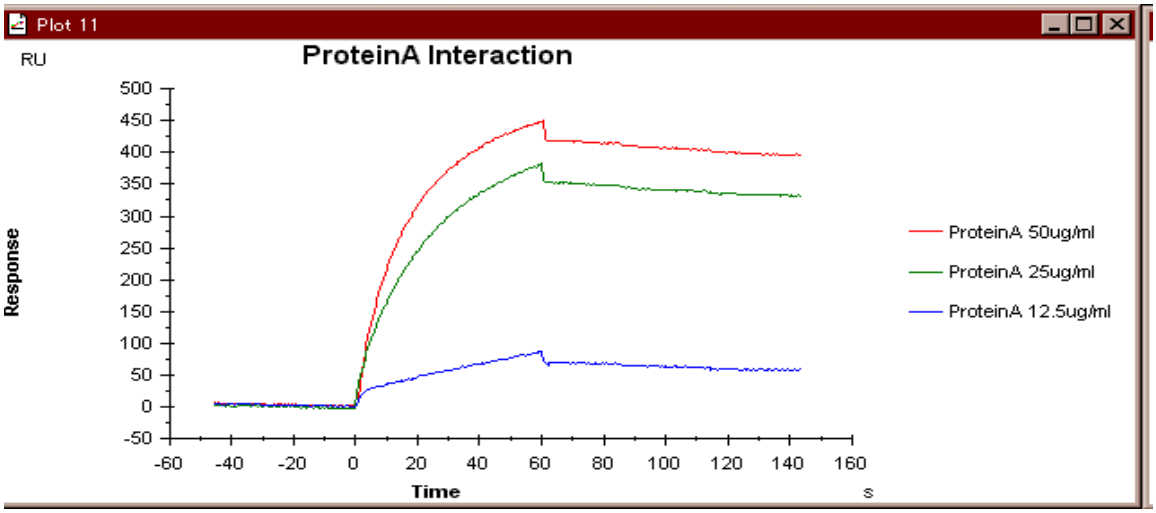
①グラフのタイトル

センサーグラム中にタイトルを入力することができます。

View → **Labels** をクリックします。任意のタイトルを入力し、**OK** をクリックします。



グラフ中の X 軸,Y 軸の表示を変更したい場合も、この **Labels** ボックス中で操作できます。☐Auto Labels のチェックを外し、必要事項を入力します。

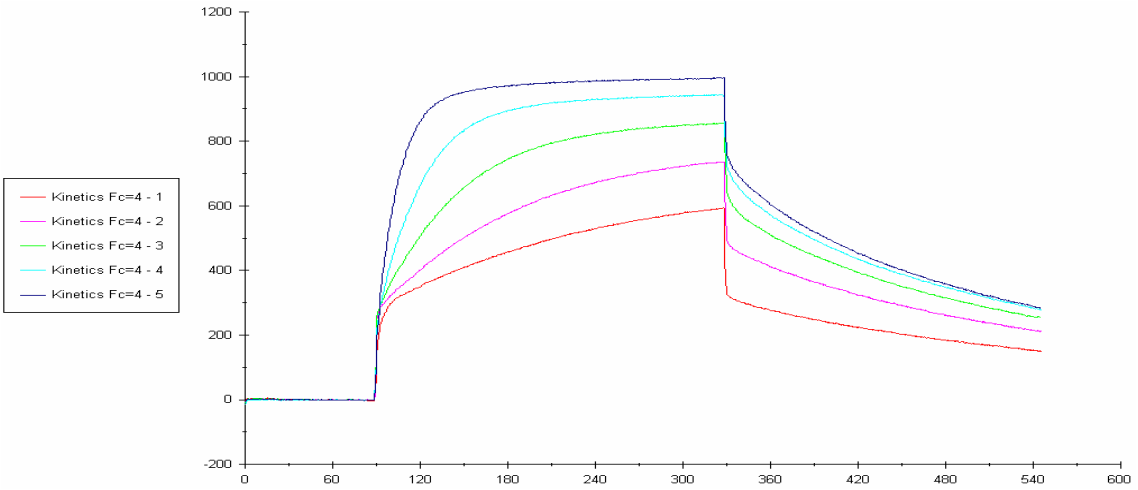


②センサーグラムの凡例

View → **Legend** をクリックします。凡例表を示したいグラフ中の位置を選択し、**OK** をクリックします。

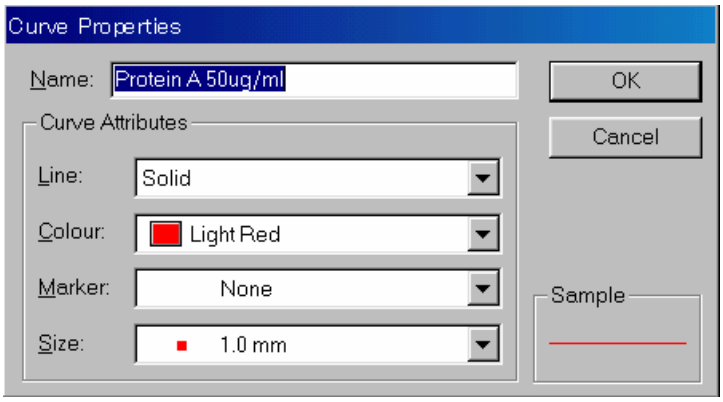
凡例を表示させたい位置を選択し、**OK** をクリックします。

Hidden	凡例を表示しない
Left	グラフの左に表示
Top	グラフの上に表示
Right	グラフの右に表示
Bottom	グラフの下に表示

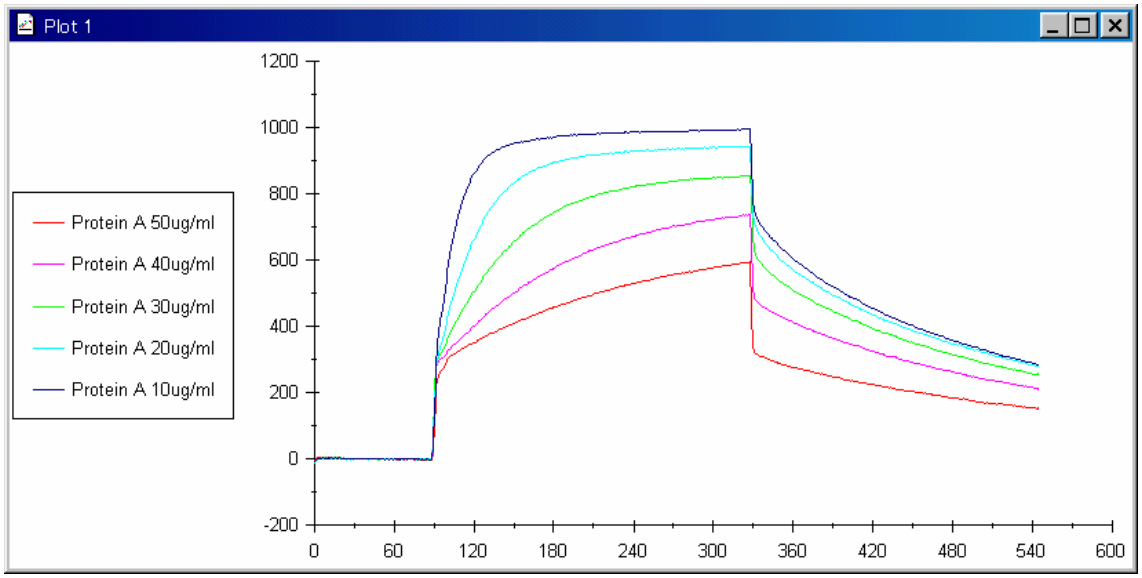


ここで表示されるのは Project で表示されているセンサーグラムの名前が表示されます。

センサーグラム上でダブルクリックし、**Curve Properties** を表示させます。**Name:** 中に凡例として表示したい内容を記載し、**OK** をクリックします。



必要なセンサーグラムの名前をすべて変更し、**OK** をクリックします。

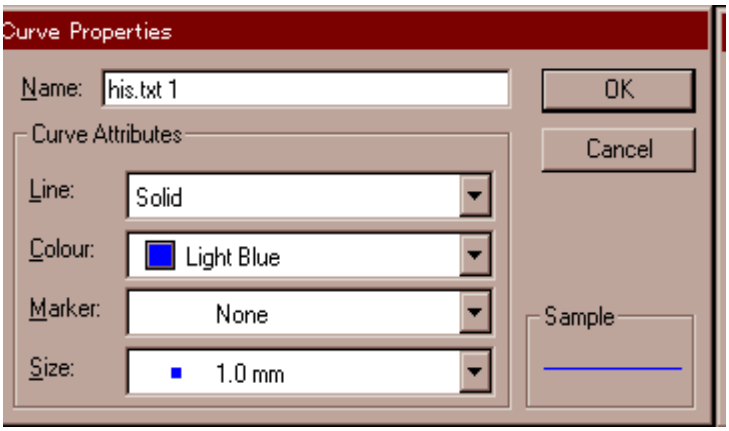


③センサーグラムの色,その他表示の変更

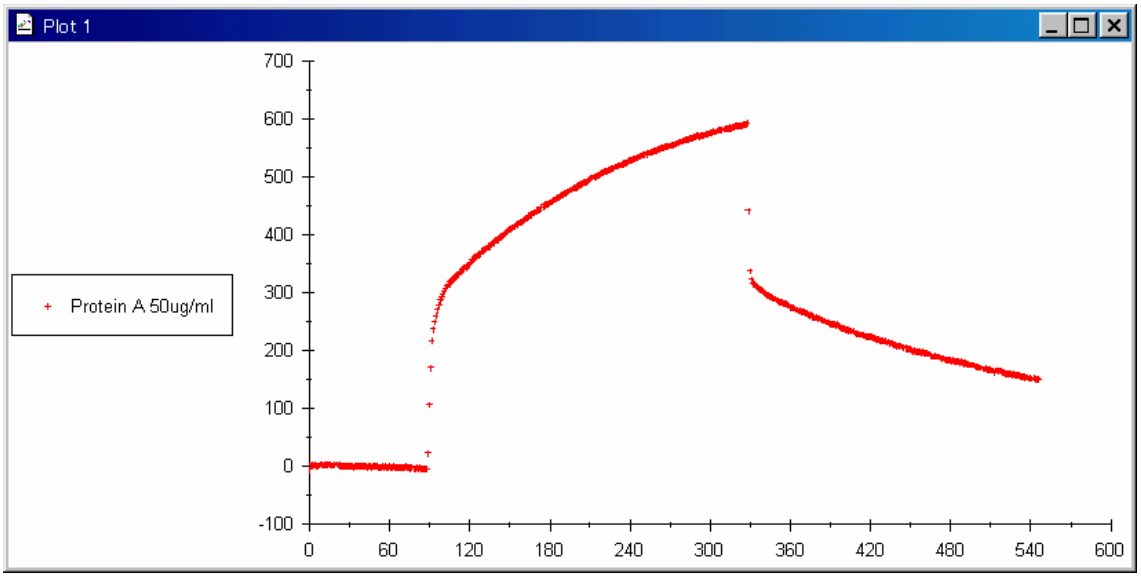
センサーグラム上をダブルクリックし、**Curve Properties** を表示させます。

Color:

の▼をクリックし、カラーを変更し、**OK** をクリックします。その他、センサーグラムの名前、線の有無、線のサイズ、マーカーの大きさ等をここで変更できます。

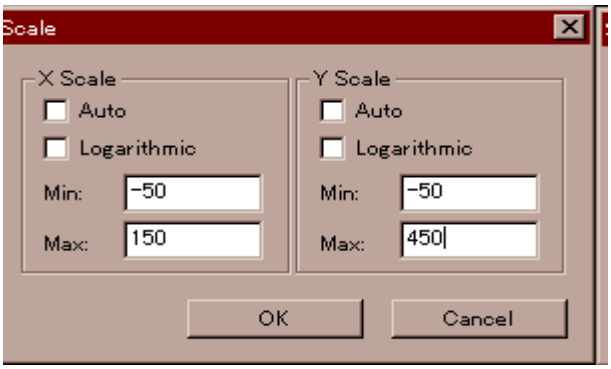


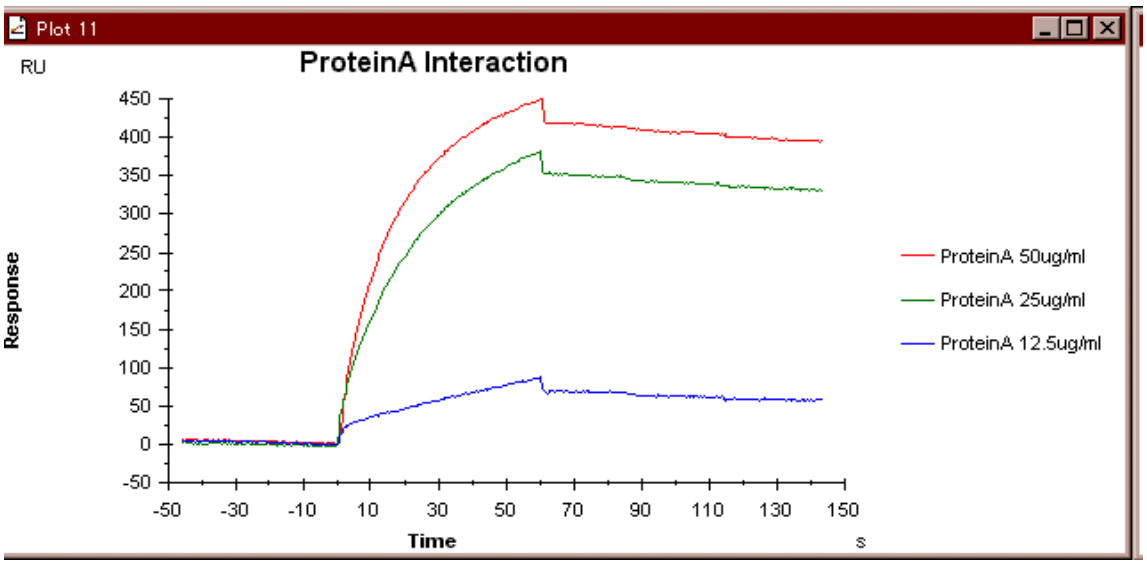
(Marker 変更例)



④グラフの表示スケール

View → **Scale** をクリックします。☐Auto 中のチェックを外し、X 軸,Y 軸のスケールを入力し、**OK** をクリックします。



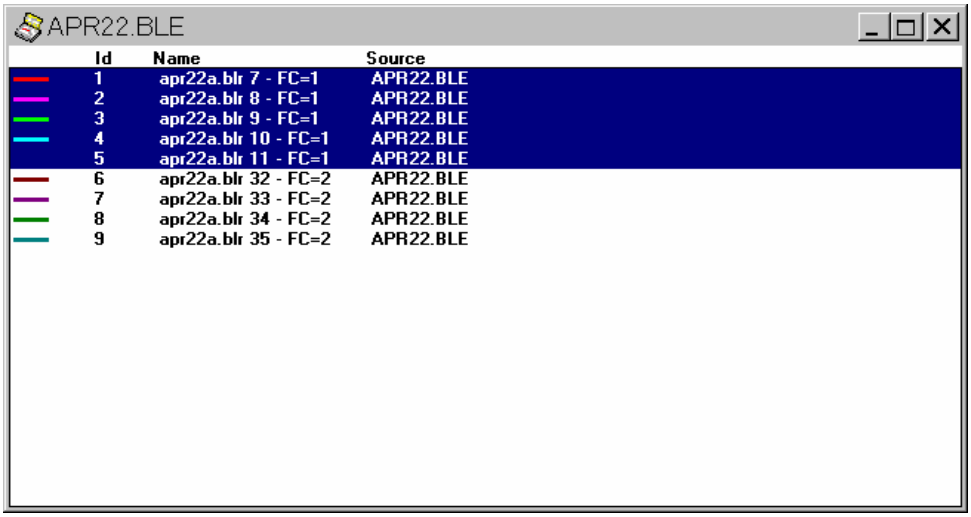


2.反応速度定数の算出

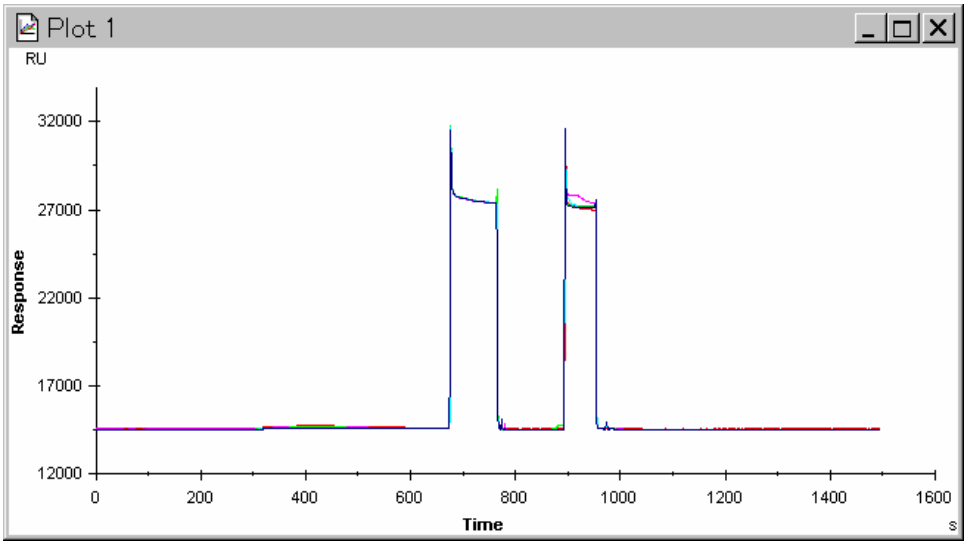
2-1. 非線形解析（Non-Linear Fitting）

①グラフの重ね書き

ファイル（Apr22 . blr）を呼び出します。

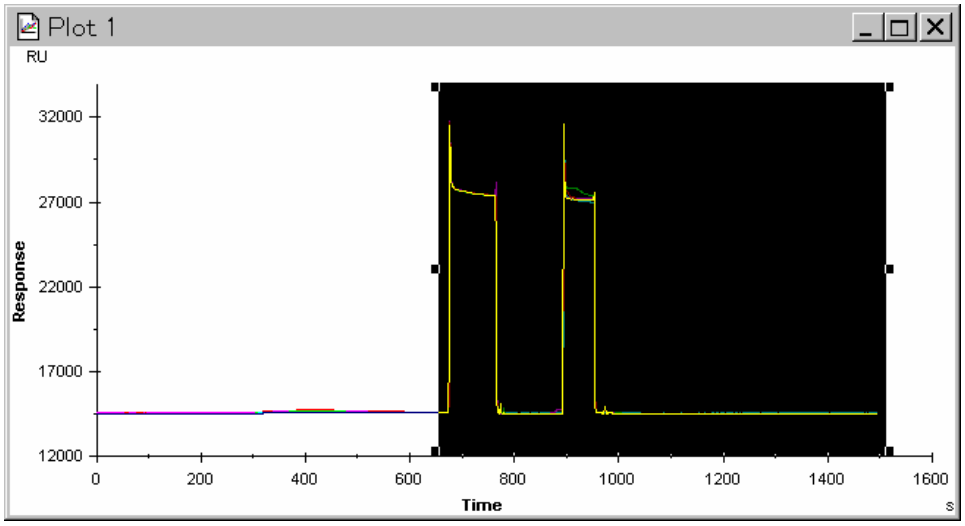


上から 5 個を選択し、重ね書きします。

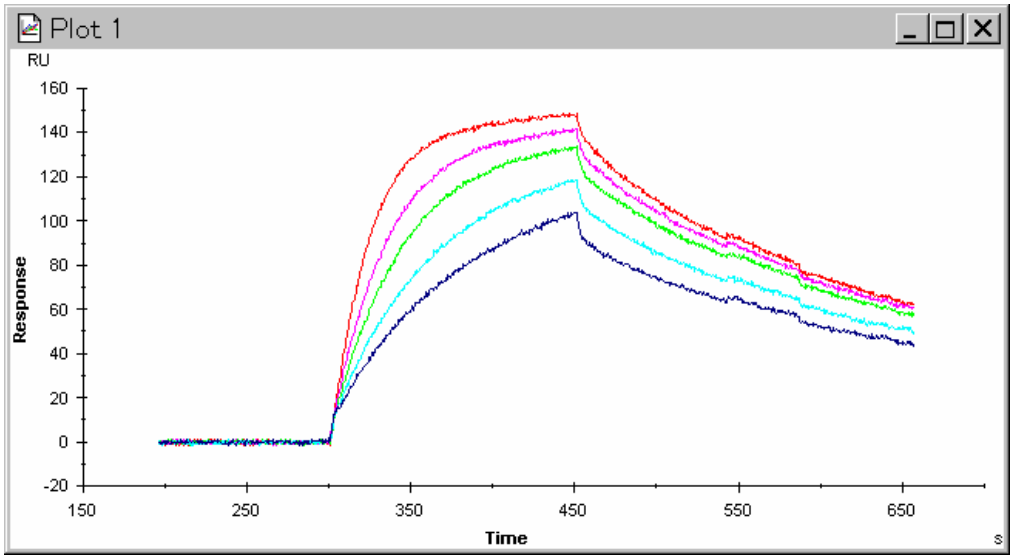


２個の大きいピークは再生操作なので、ここを削除します。

2.反応速度定数の算出

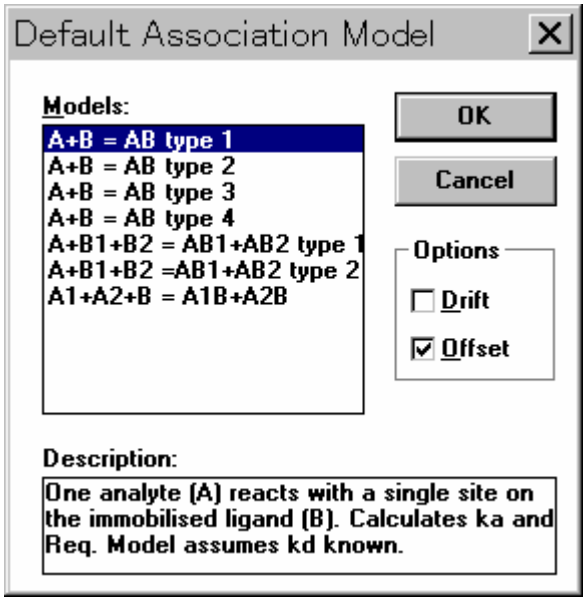


Edit → **Cut** で削除した後、 **Calculate** → **Y-Transform...**ベースラインをあわせます。



②反応様式の設定

Fit → **Preference** → **Association Model** をクリックします。



解説

A：アナライト　**B**：リガンド

A + B = AB

1 対 1 の反応（1 種類のリガンドと 1 種類のアナライトとの反応）

Type 1, Type 2　(非線形解析)　Non-Linear Fitting

Type 3, Type 4　(線形解析)　Linear Fitting

A + B1 + B2 = AB1 + AB2

2 種類の異なる結合部位を持つリガンドと 1 種類のアナライトとの反応

Type 1, Type 2　(非線形解析)　Non-Linear Fitting

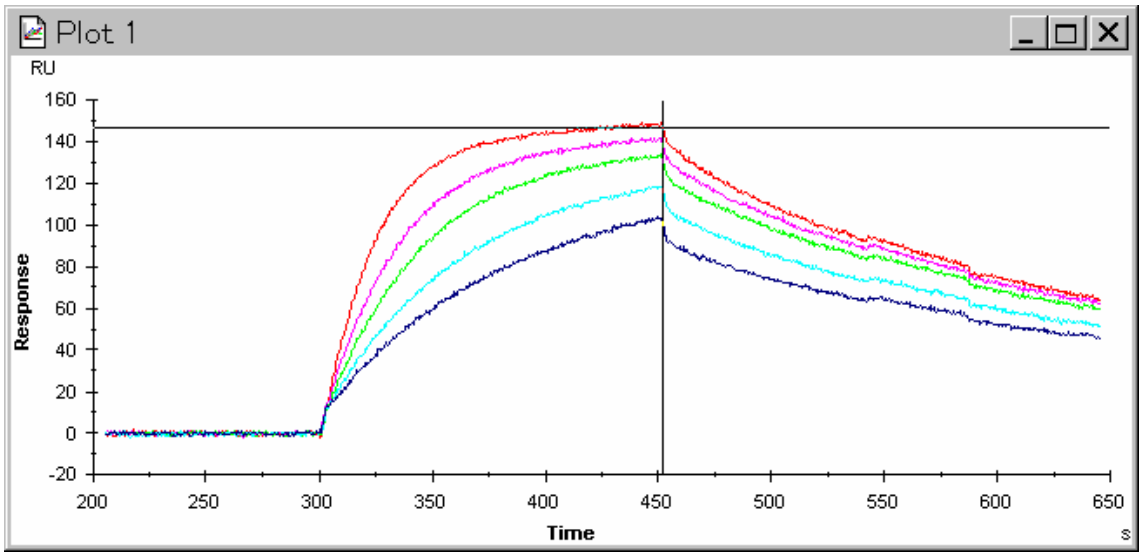
A1+ A2 + B = A1B + A2B

1 種類のリガンドと 2 種類のアナライトとの反応（Competition assay）

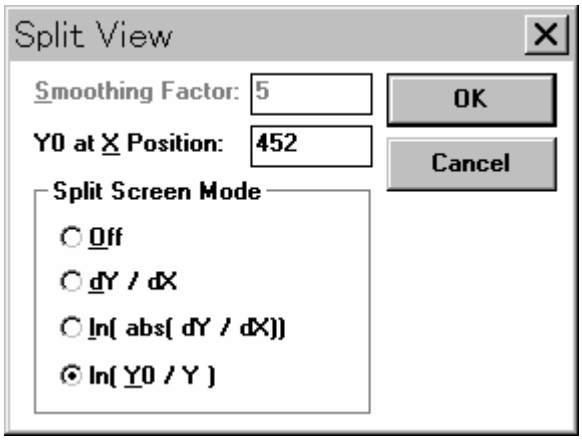
A + B = AB　**Type 1** あるいは **Type 2** を選択し、**OK** をクリックします。

③解離速度定数（k_d）の算出

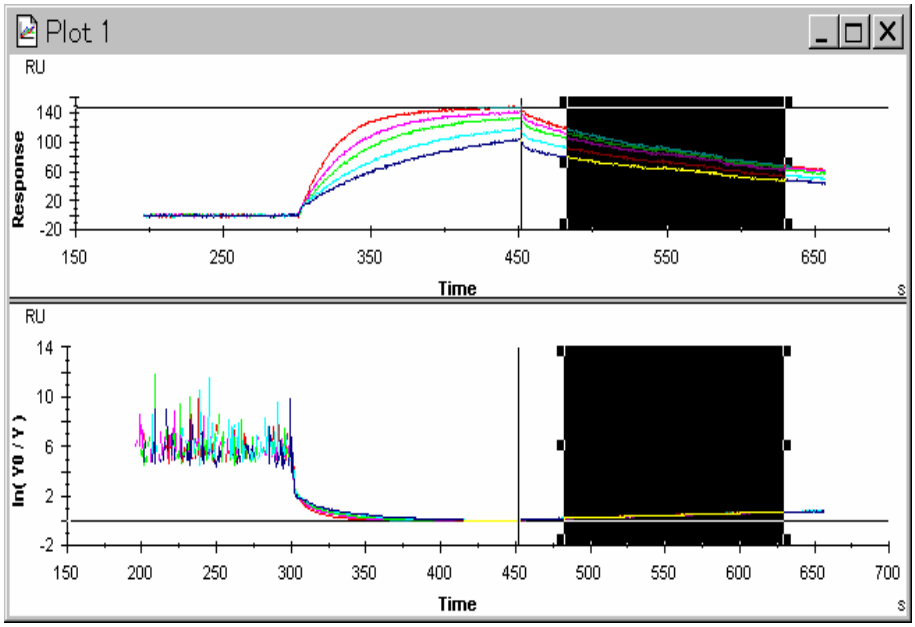
アイコン（ ）をクリックし、リファレンスラインを表示し、センサーグラムの結合領域と解離領域の境に移動します。



View → **Split View** をクリックします。

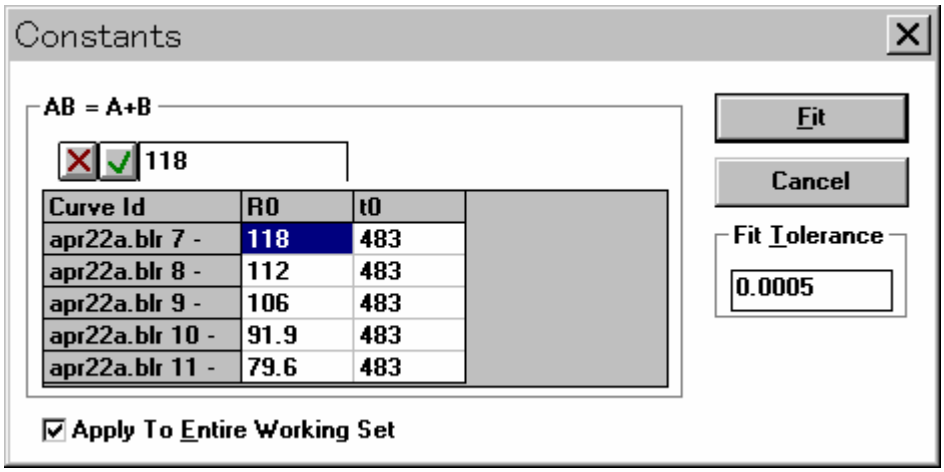


一番下の **ln(Y0/Y)** を選択し、**OK** をクリックします。

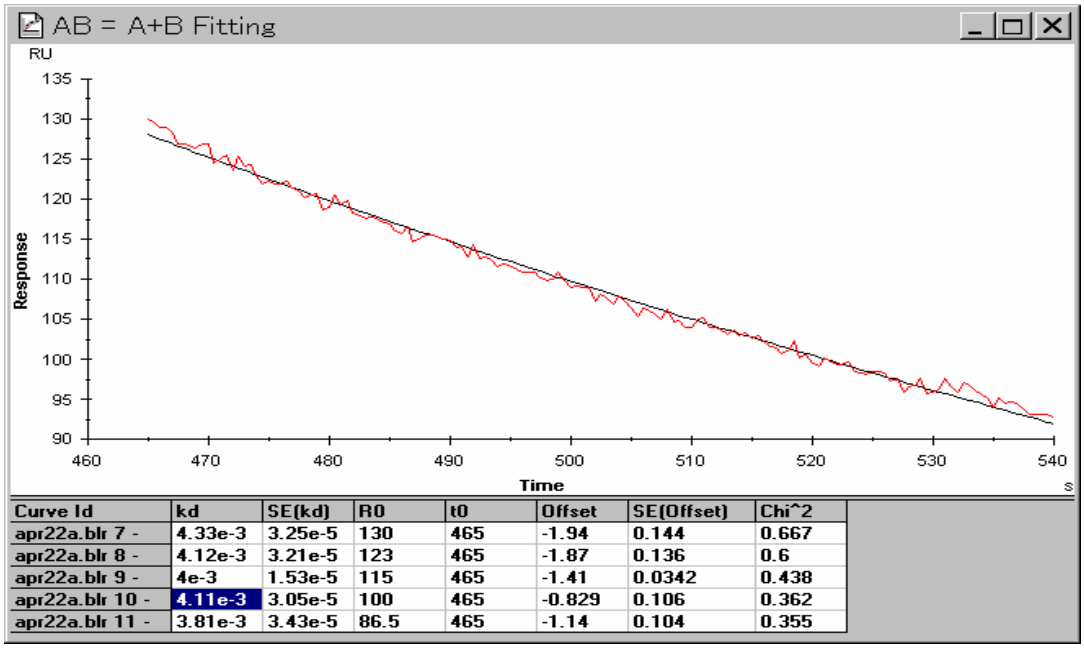


下のグラフで直線性のある解離範囲をマウスの右ボタンをドラッグし設定します。（直線性のあるできるだけ広い範囲を設定してください。）

アイコン（ ）あるいは **Fit** → **Dissociation Kinetics....**をクリックします。



Fit をクリックします。



Curve Id	kd	SE(kd)	R0	t0	Offset	SE(Offset)	Chi^2
apr22a.blr 7 -	4.33e-3	3.25e-5	130	465	-1.94	0.144	0.667
apr22a.blr 8 -	4.12e-3	3.21e-5	123	465	-1.87	0.136	0.6
apr22a.blr 9 -	4e-3	1.53e-5	115	465	-1.41	0.0342	0.438
apr22a.blr 10 -	4.11e-3	3.05e-5	100	465	-0.829	0.106	0.362
apr22a.blr 11 -	3.81e-3	3.43e-5	86.5	465	-1.14	0.104	0.355

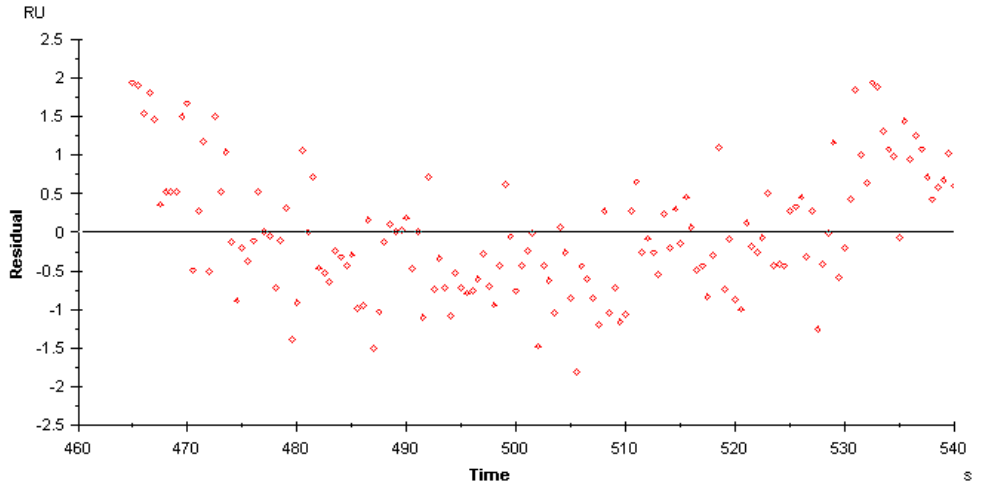
計算結果が表示されます。それぞれのグラフで解離速度定数（k_d）が計算されます。

良好な結果であるかの確認方法

(1)テーブルに表示されている各センサーグラム間での ***k_d* 値**が安定しているか確認してください。

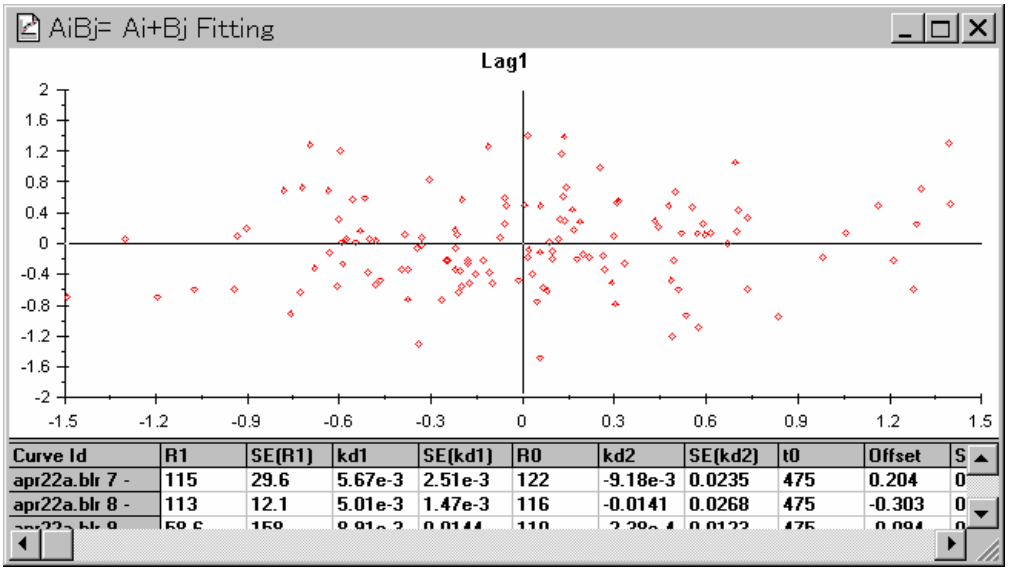
(2)テーブルに表示されている **Chi2** の値が **20** 以下であるか確認します。

(3)アイコン（ ）をクリックし、**Residual Plot** を表示させます。



直線を中心に**±2RU** 以下で平均的にばらつきいているか確認してください。

(4)アイコン（ ）をクリックし、**Lag 1 plot** を表示します。



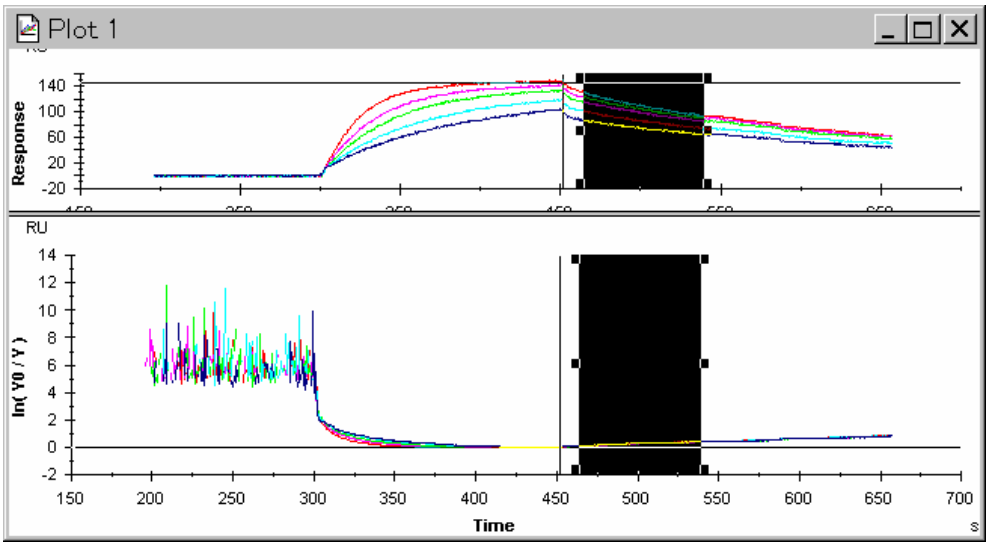
Curve Id	R1	SE(R1)	kd1	SE(kd1)	R0	kd2	SE(kd2)	t0	Offset	S
apr22a.blr 7 -	115	29.6	5.67e-3	2.51e-3	122	-9.18e-3	0.0235	475	0.204	0
apr22a.blr 8 -	113	12.1	5.01e-3	1.47e-3	116	-0.0141	0.0268	475	-0.303	0

直線の交点を中心に、**±2RU** 以下で平均的にばらつきいているか確認してください。

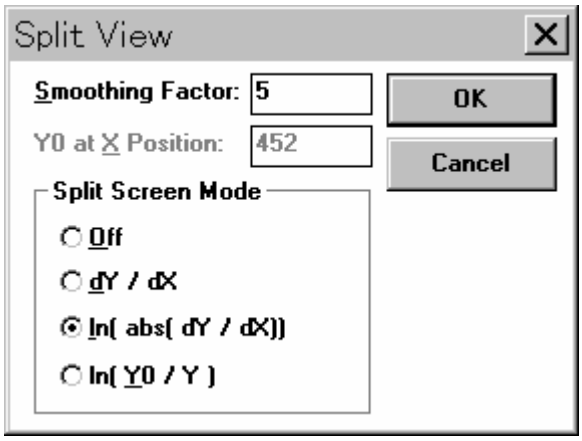
(5)アイコン（ ）をクリックし、**Lag2 plot** を表示させます。 **Lag1 plot** と同様にばらつきを確認してください。

④結合速度定数（k_a）の算出

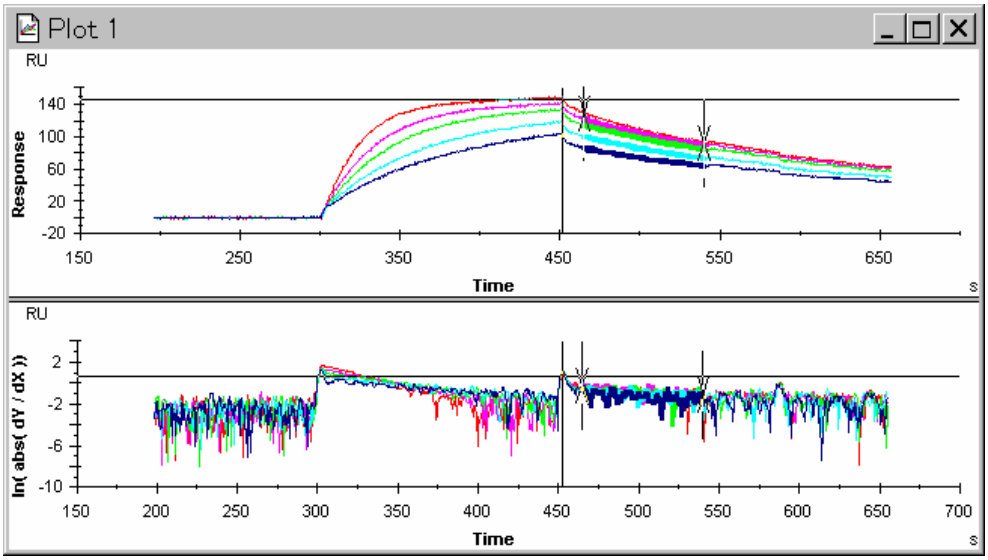
Window → **Plot** をクリックし、１つ前のセンサーグラムに戻します。



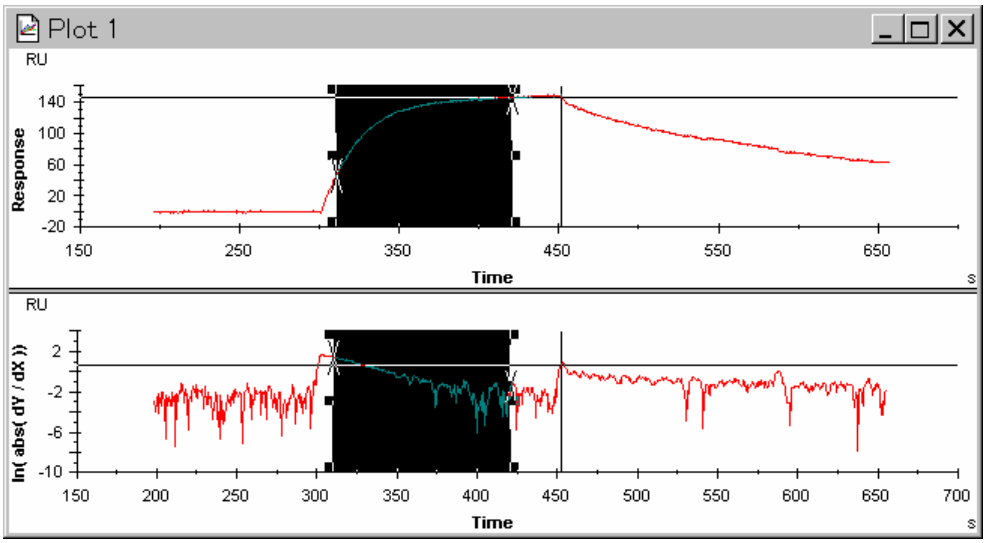
View → **Split View** をクリックします。



下から２番目の **ln(abs(dY/dX))** を選択し、**OK** をクリックします。



結合領域はアナライト濃度の依存を受けますので、範囲の設定は 1 本ずつ行います。
アイコン（ ）をクリックし、１本表示します。



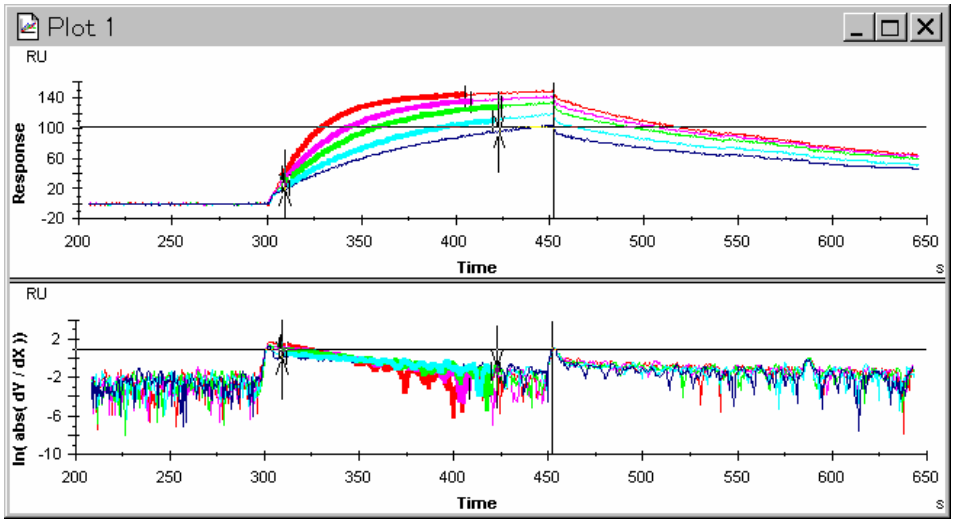
直線性のある範囲をマウスの右ボタンをドラッグし、設定します。(直線性のある比較的広い範囲を設定してください。)

カーブリスト（

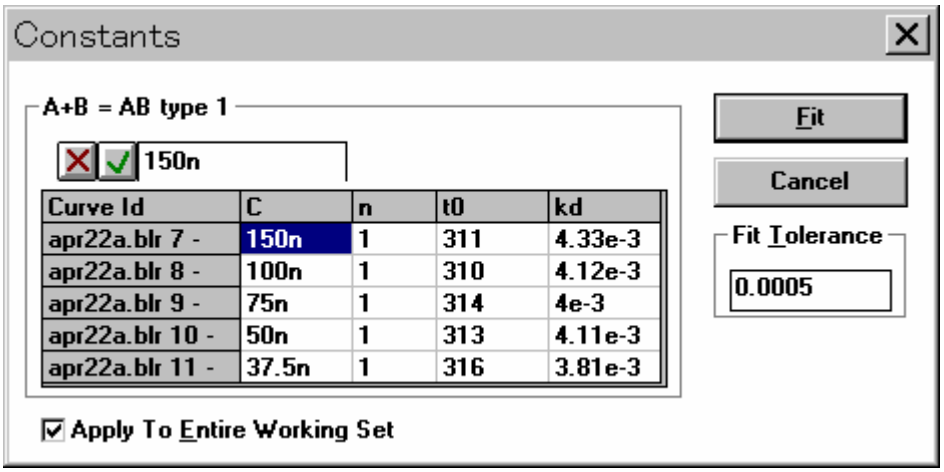
）中のカーブを変更して、すべてのセンサーグラムについて範囲を設定します。

範囲を設定後、アイコン（ ）をクリックし、再び重ね書きにします。

2.反応速度定数の算出



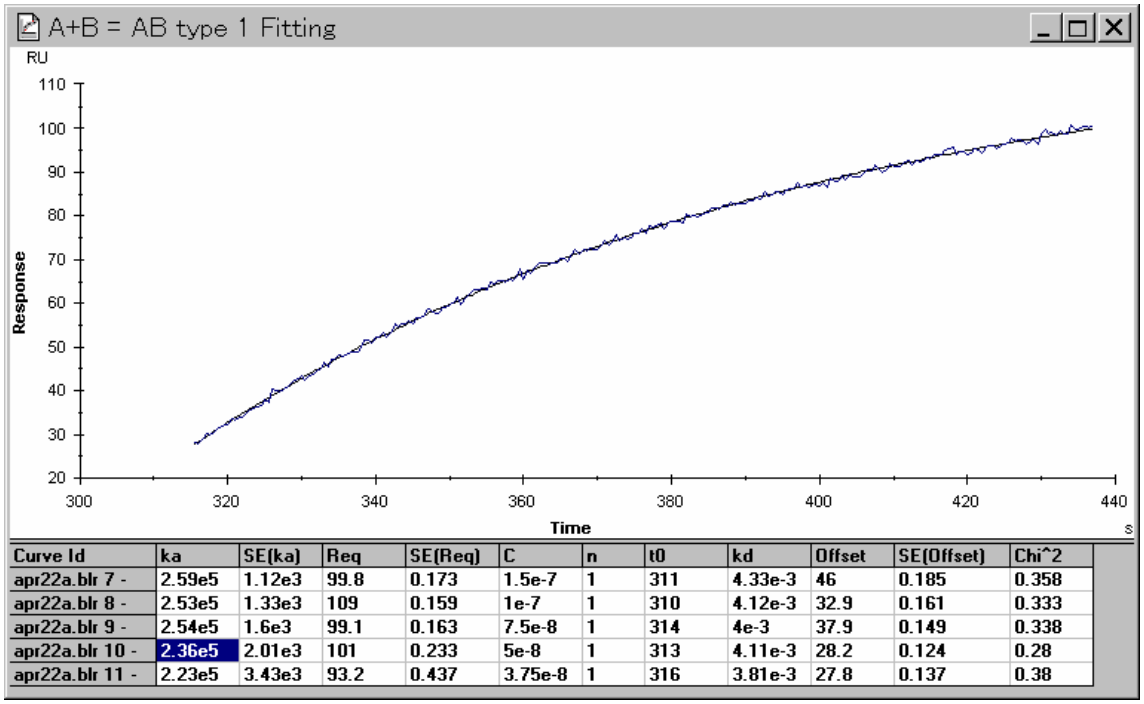
アイコン（ ）あるいは **Fit** → **Association Kinetics...**をクリックします。



アナライト濃度を入力し、**Fit** をクリックします。

濃度の入力の仕方

単位	入力文字	例
aM	a	100a
fM	f	100f
pM	p	100p
nM	n	100n
μM	u	100u
mM	m	100m
M		100
kM	k	100k



Curve Id	ka	SE(ka)	Req	SE(Req)	C	n	t0	kd	Offset	SE(Offset)	Chi^2
apr22a.blr 7 -	2.59e5	1.12e3	99.8	0.173	1.5e-7	1	311	4.33e-3	46	0.185	0.358
apr22a.blr 8 -	2.53e5	1.33e3	109	0.159	1e-7	1	310	4.12e-3	32.9	0.161	0.333
apr22a.blr 9 -	2.54e5	1.6e3	99.1	0.163	7.5e-8	1	314	4e-3	37.9	0.149	0.338
apr22a.blr 10 -	2.36e5	2.01e3	101	0.233	5e-8	1	313	4.11e-3	28.2	0.124	0.28
apr22a.blr 11 -	2.23e5	3.43e3	93.2	0.437	3.75e-8	1	316	3.81e-3	27.8	0.137	0.38

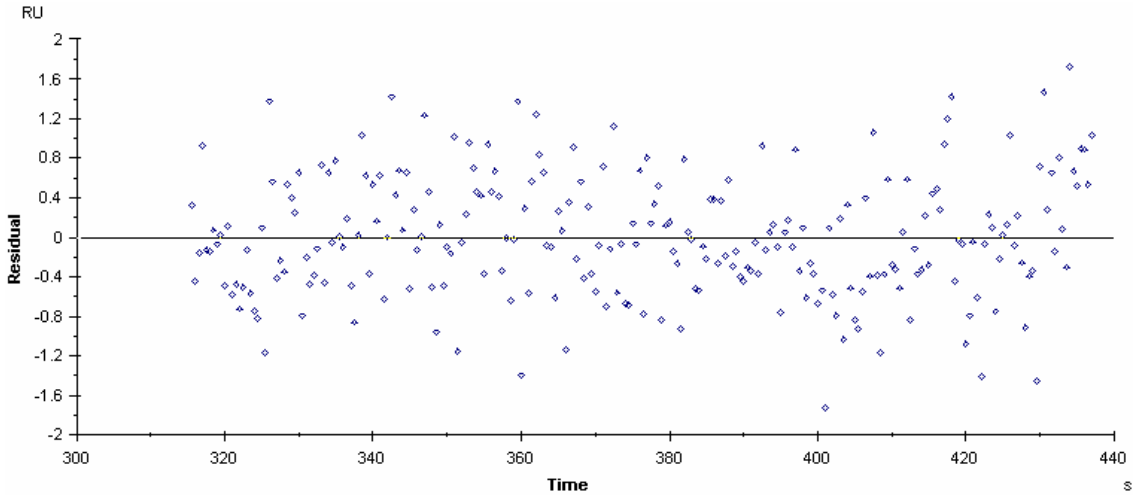
計算結果が表示されます。それぞれのセンサーグラムから結合速度定数（k_a）が計算されます。

良好な結果であるかの確認方法

(1)テーブルに表示されている各センサーグラム間での **k_a 値**が安定しているか確認してください。

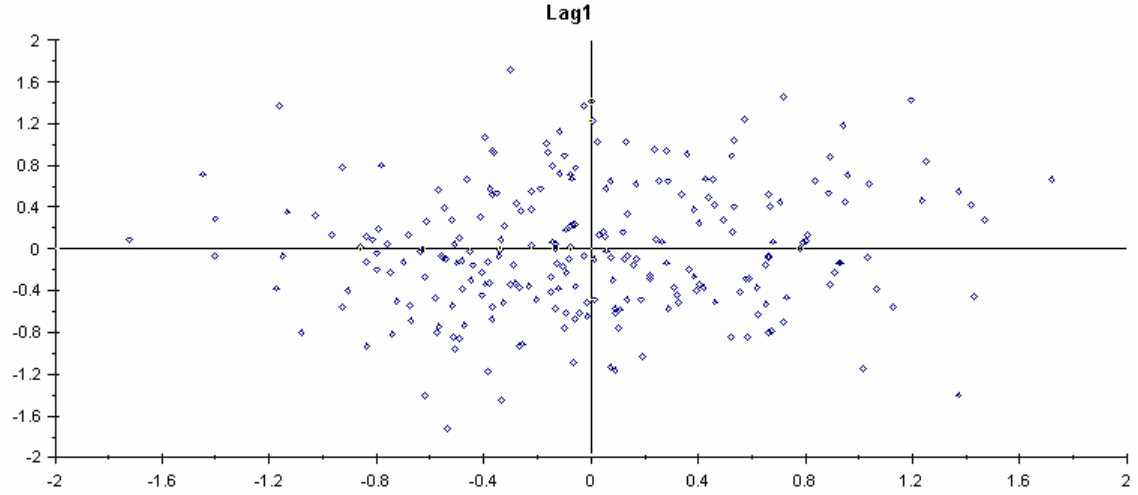
(2)テーブルに表示されている **Chi2** の値が **20** 以下であるか確認します。

(3)アイコン（ ）をクリックし、**Residual　Plot** を表示させます。



直線を中心に**±2RU** 以下で平均的にばらつきいているか確認してください。

(4)アイコン（ ）をクリックし、**Lag 1 plot** を表示します。



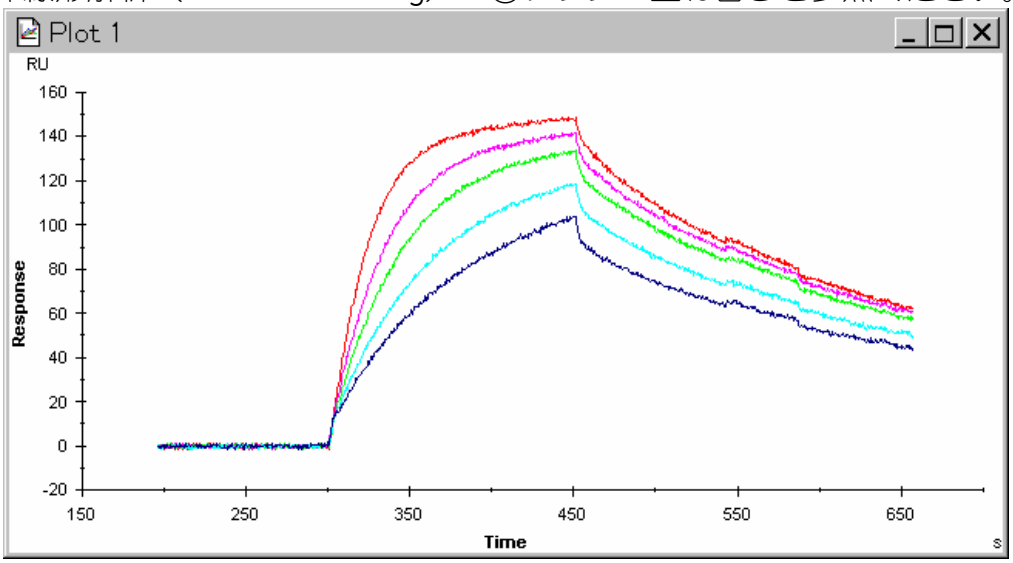
直線の交点を中心に、**±2RU** 以下で平均的にばらつきいているか確認してください。

(5)アイコン（ ）をクリックし、**Lag2 plot** を表示させます。 Lag1 plot と同様にばらつきを確認します。

2-2. 線型解析（Linear Fitting）

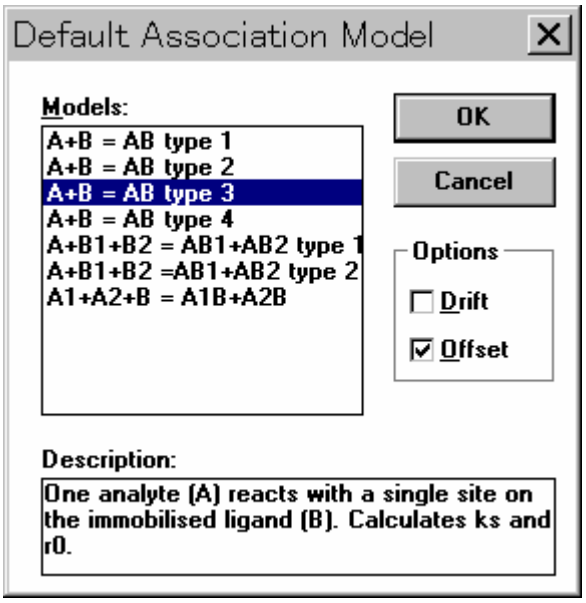
①グラフの重ね書き

2-1.非線形解析（Non-Linear Fitting）の①グラフの重ね書きを参照ください。



②反応様式の設定

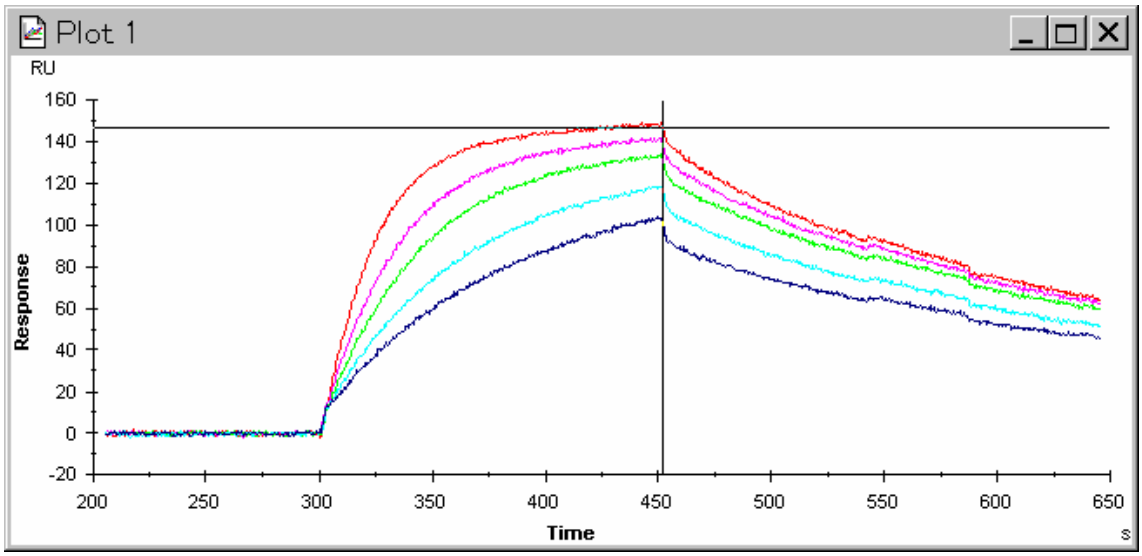
Fit → **Preference** → **Association Model** をクリックします。



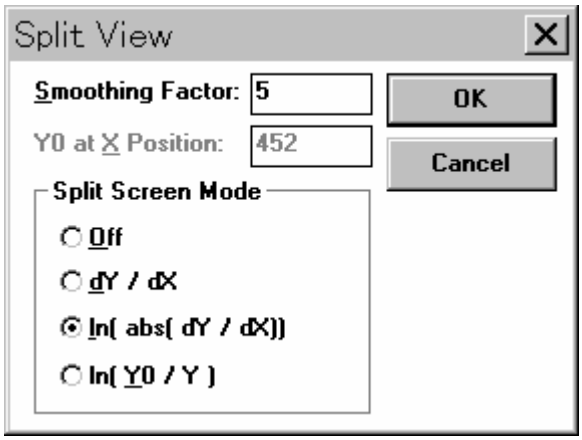
A + B = AB　Type 3 あるいは **Type 4** を選択し、**OK** をクリックします。

③反応速度定数の算出

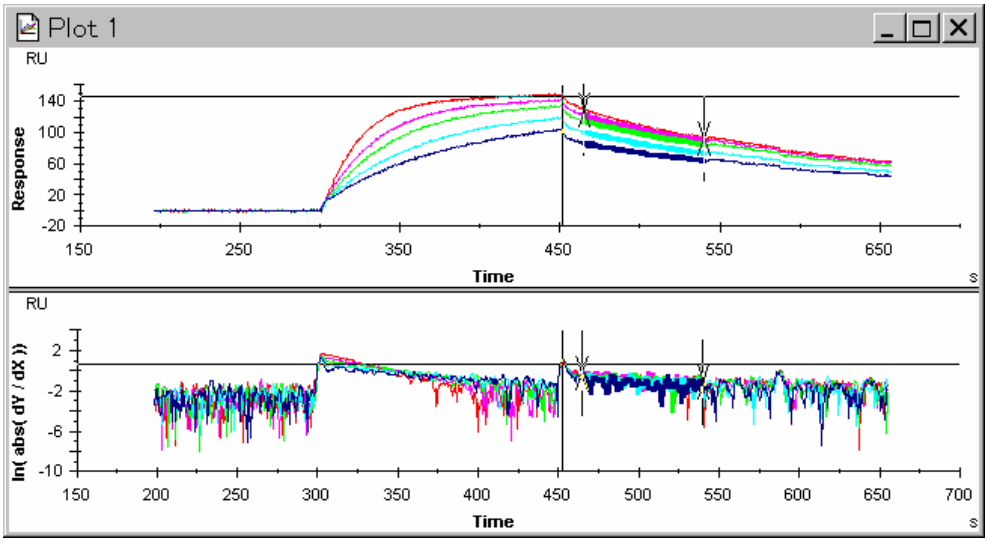
アイコン（ ）をクリックし、リファレンスラインを表示し、センサーグラムの結合領域と解離領域の境に移動します。



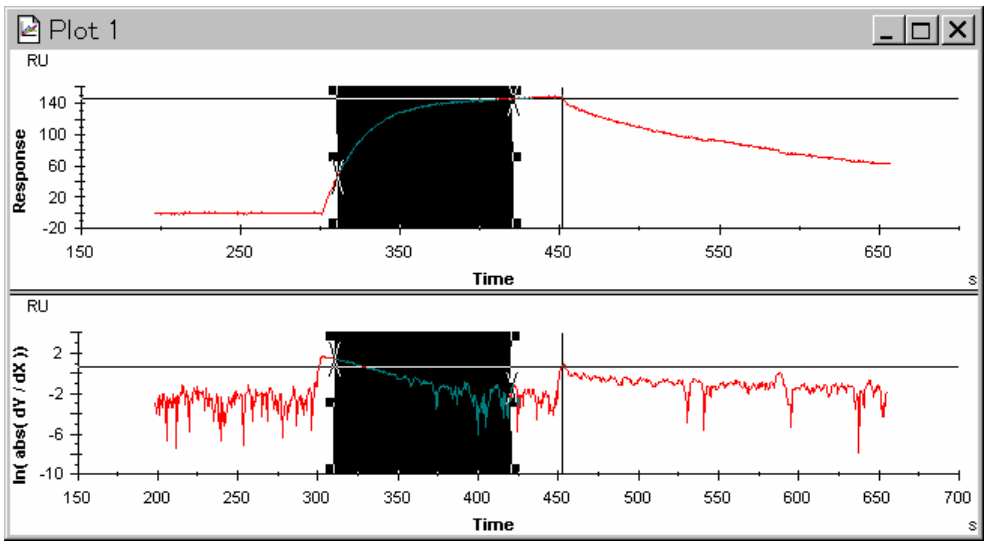
View → **Split View** をクリックします。



下から２番目の **ln(abs(dY/dX))** を選択し、**OK** をクリックします。



結合領域はサンプル濃度の依存を受けますので、範囲の設定は 1 本ずつ行います。
アイコン（ ）をクリックし、１本表示します。



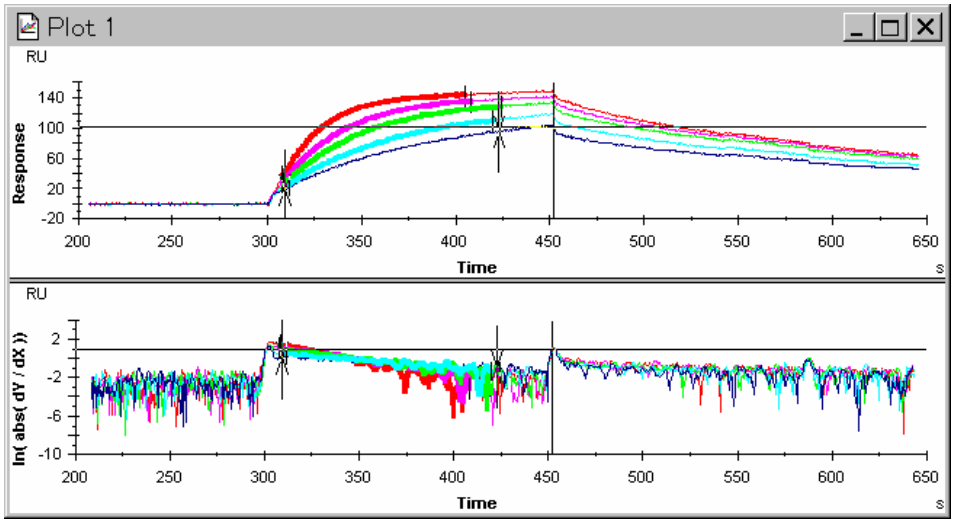
直線性のある範囲をマウスの右ボタンを使用し、設定します。(直線性のある比較的広い範囲を設定してください。)

カーブリスト（

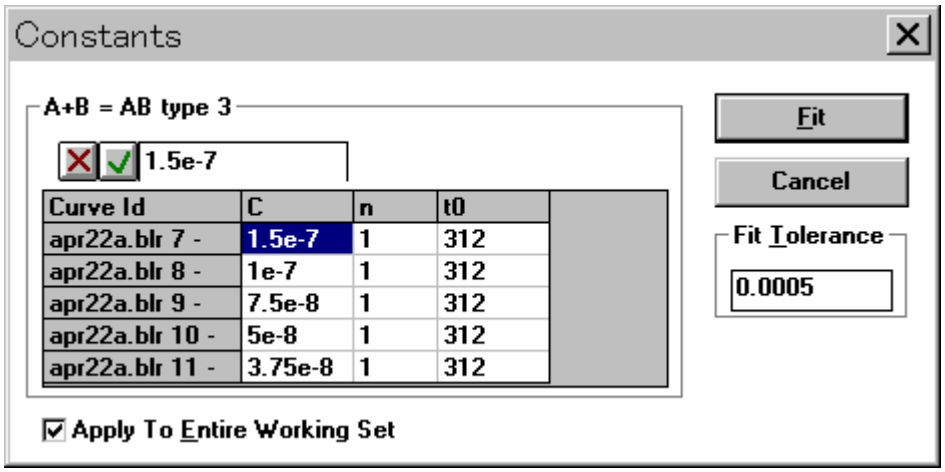
）中のカーブを変更して、すべてのカーブについて範囲を設定します。

範囲を設定後、アイコン（ ）をクリックし、再び重ね書きにします。

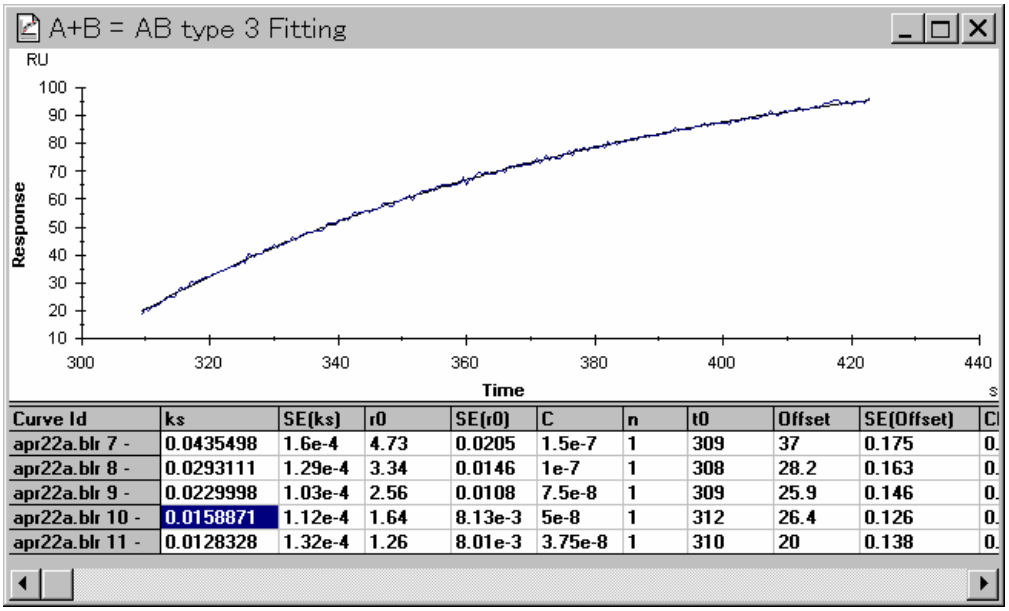
2.反応速度定数の算出



アイコン（ ）あるいは **Fit** → **Association Kinetics...**をクリックします。

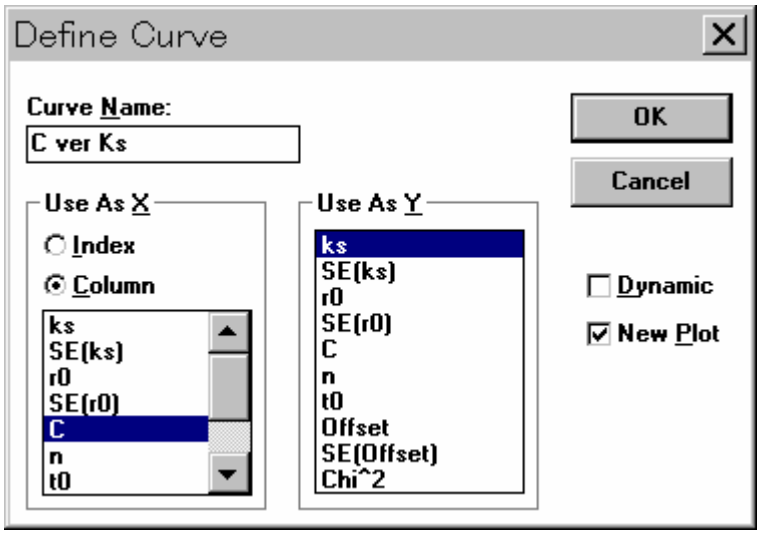


アナライトの濃度は 30 ページを参照に入力し、**Fit** をクリックします。



Curve Id	ks	SE(ks)	r0	SE(r0)	C	n	t0	Offset	SE(Offset)	Cl
apr22a.blr 7 -	0.0435498	1.6e-4	4.73	0.0205	1.5e-7	1	309	37	0.175	0.
apr22a.blr 8 -	0.0293111	1.29e-4	3.34	0.0146	1e-7	1	308	28.2	0.163	0.
apr22a.blr 9 -	0.0229998	1.03e-4	2.56	0.0108	7.5e-8	1	309	25.9	0.146	0.
apr22a.blr 10 -	0.0158871	1.12e-4	1.64	8.13e-3	5e-8	1	312	26.4	0.126	0.
apr22a.blr 11 -	0.0128328	1.32e-4	1.26	8.01e-3	3.75e-8	1	310	20	0.138	0.

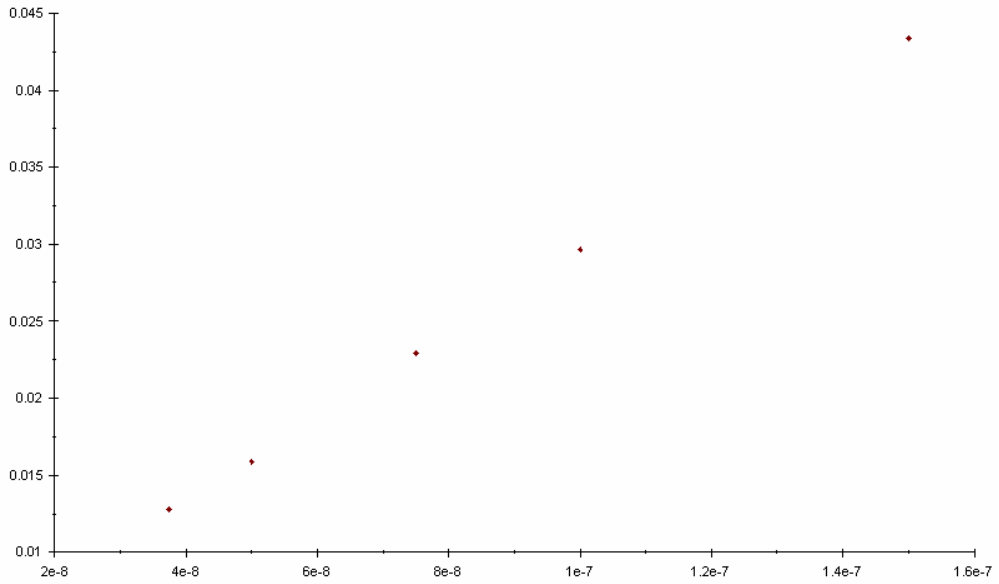
Table → Define Curve...をクリックします。



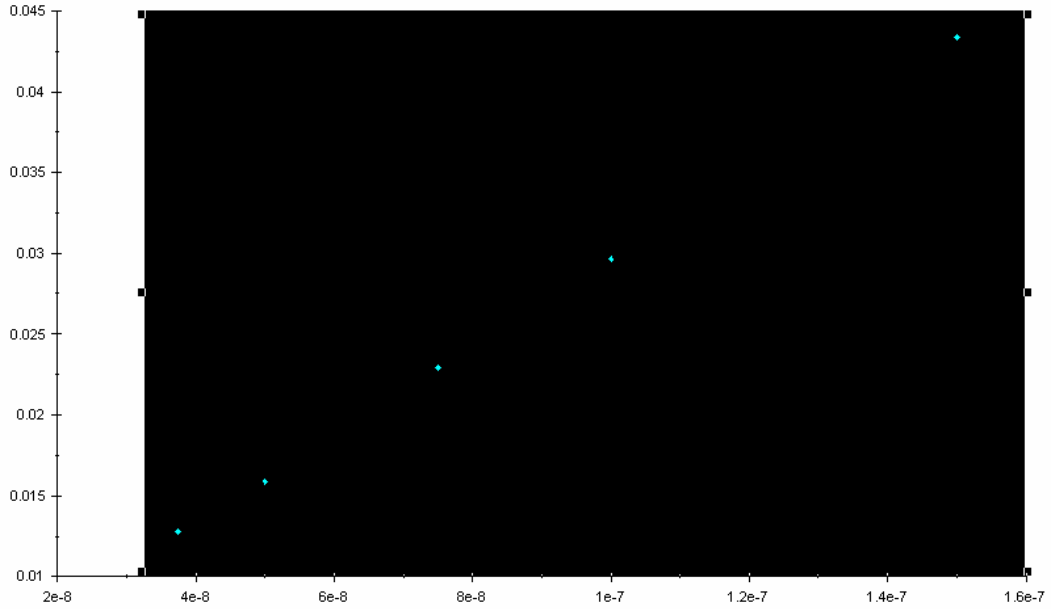
Curve　Name に適当な名前を入力します（入力しなくても結構です）。

X軸に **C**、Y軸に **ks** を選択し、**OK** をクリックします。

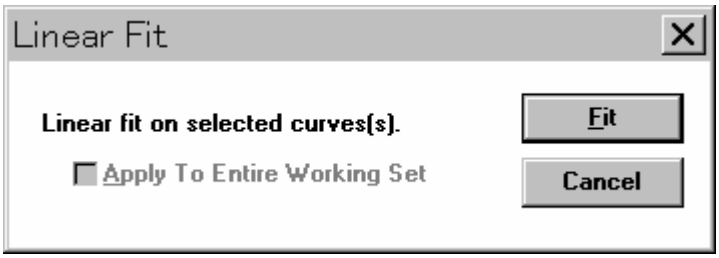
2.反応速度定数の算出



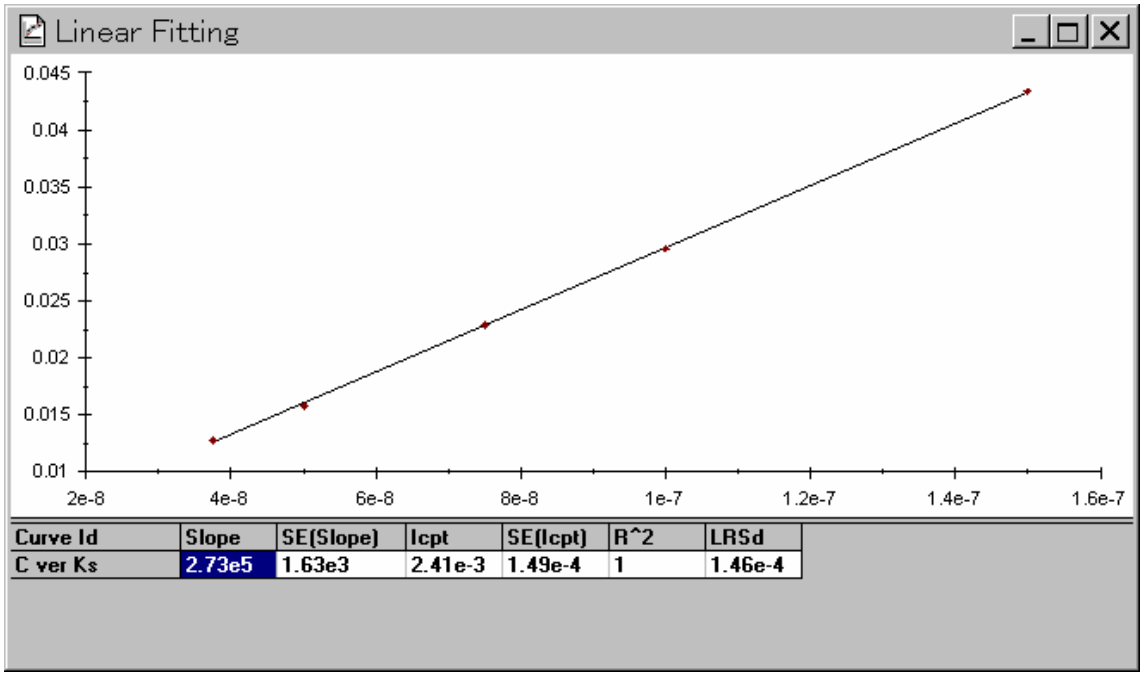
マウスの右のボタンを使いドラッグし、直線性のある範囲を広く設定します。



アイコン（ ）あるいは **Fit Linear Fit...**をクリックします。



Fit をクリックします。



計算結果が表示されます。

Slope ： **結合速度定数（k_a）**
Icpt ： **解離速度定数（k_d）**

注意

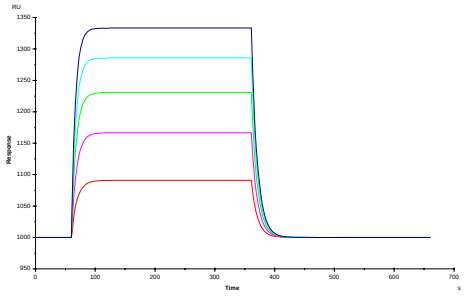
ここで計算される解離速度定数（Icpt）は、信頼性が低くなります。非線形解析（Non-Linear Fitting）によって算出した値を使用することをおすすめします。

3.低アフィニティーの解離定数算出

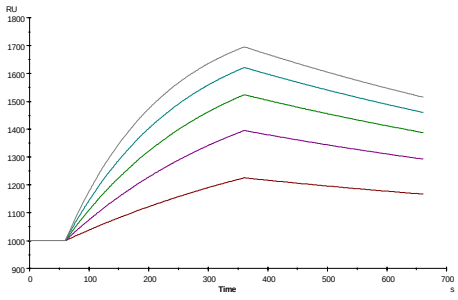
Biacore は、解離定数（K_D, Affinity）のみならず結合速度定数（k_a）および解離速度定数（k_d）を算出することが可能です。Biacore がモニターしているのは、センサーチップ表面近傍の微細な質量変化であるために、低アフィニティーの相互作用や、アナライトが低分子の場合のレスポンスは必然的に小さくなります。低アフィニティーでかつアナライトが低分子の相互作用の場合には、解離が速く、検出が困難となります。

低アフィニティーの場合（特に解離速度定数（k_d）が大きい場合：解離が速い場合）、反応はきわめて早く平衡状態（Req）に移行します（下図）。

k_a = 1×10^5 M^{-1},s^{-1}
k_d = 1×10^{-1} s^{-1}

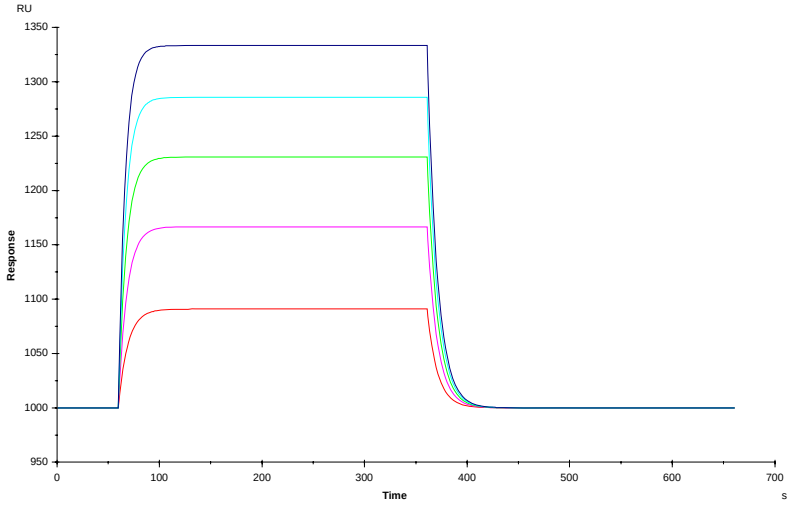


k_a = 1×10^5 M^{-1},s^{-1}
k_d = 1×10^{-3} s^{-1}



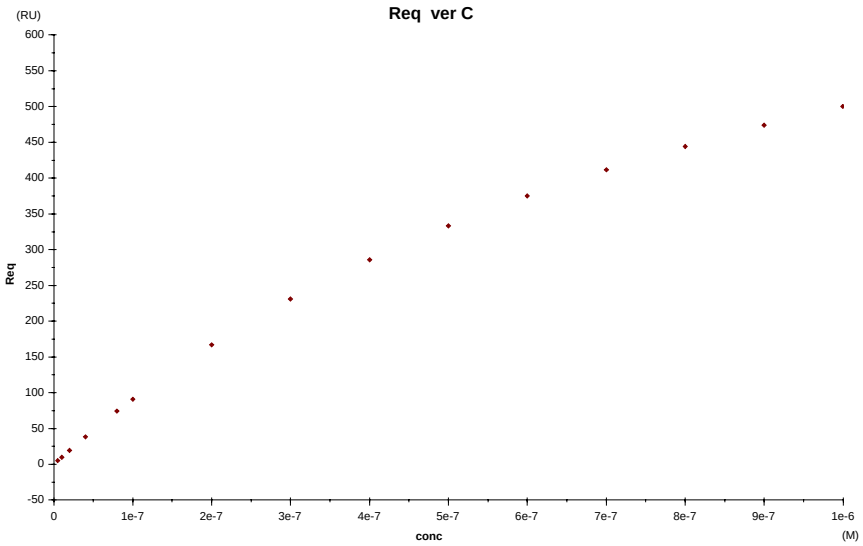
そのため、結合領域（association phase）および解離領域（dissociation phase）は極めて短時間で、解析は非常に困難となります。

このような場合には、平衡値（Req）とサンプル濃度（C）とのプロットから、結合定数（K_A）あるいは解離定数（K_D）を算出していきます。この平衡値（Req）の値には、反応によるレスポンスと、サンプル溶液自身の持つ溶液効果（bulk effect）が含まれているので、計算前に反応セルのレスポンスからコントロールセルのレスポンスを差し引いたグラフを作成します。



反応の平衡状態において、Req と濃度（C）との関係は、以下の式のようになります。

$$Req = K_A C / (1 + K_A C)$$



この式から、BIAevaluation を使用し、非線型最小二乗法により K_A を算出します。

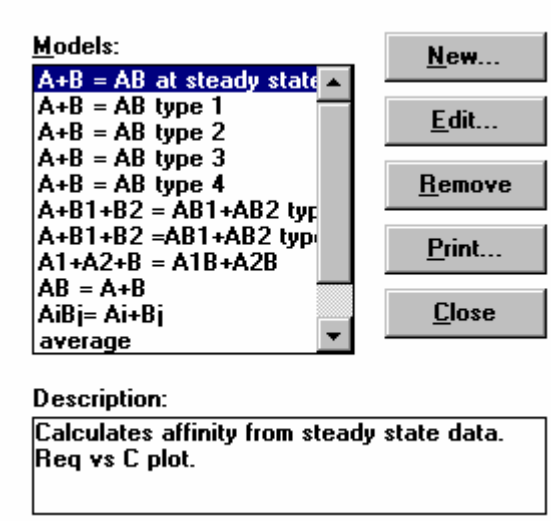
3-1. 解析モデルの設定

BIAevaluation を起動させます。

↓

Fit → Edit Models...をクリックします。

↓

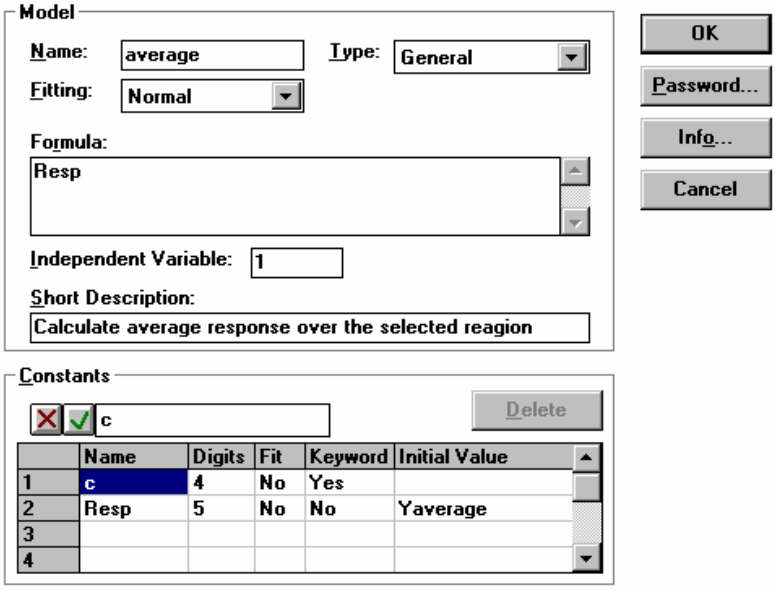


↓

New をクリックします。

↓

以下のように入力します。



OK をクリックします。

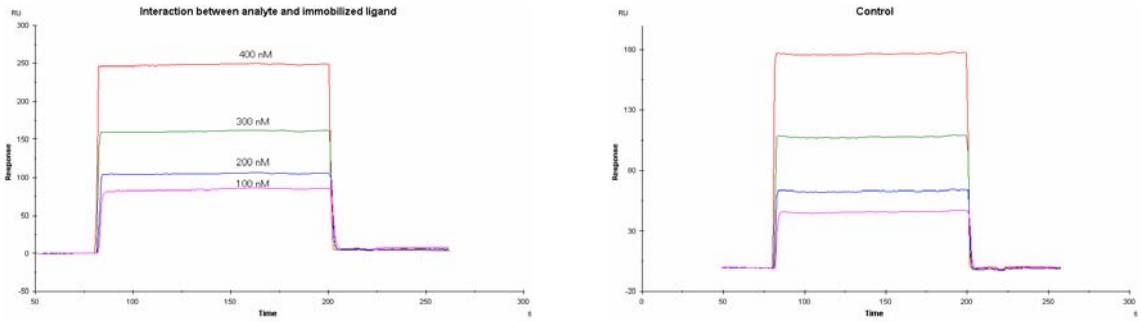
＊この設定は、Req の設定範囲の平均値を取り込むためのものです。一度設定を行えば、以後の設定は必要ありません。

3-2. 解析方法

①コントロールを差し引いたグラフの重ね書き

File → Open をクリックし、自分のファイルを呼び出します。

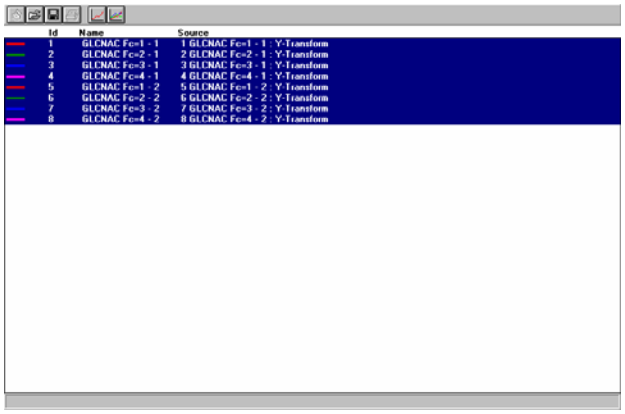
↓

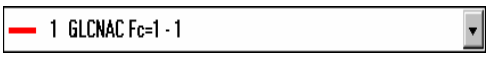


このグラフは、固定化したリガンドにアナライトの濃度を変えて反応させたものです。右側のコントロールは、何も固定化していないフローセルに同様にサンプルをインジェクションしたものです。

各グラフからそれぞれコントロールを差し引きします。

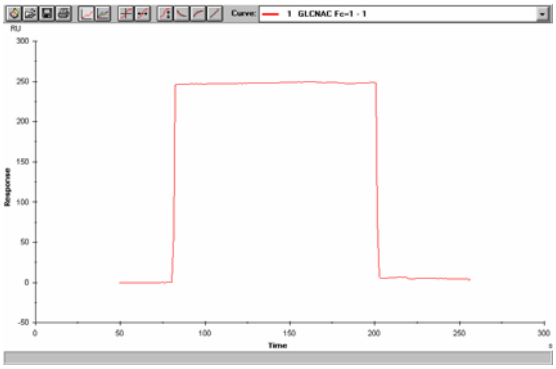
↓



すべてのグラフをハイライトにしておき、 をクリックします。カーブリスト 

に表示しているセンサーグラムが表示されます。

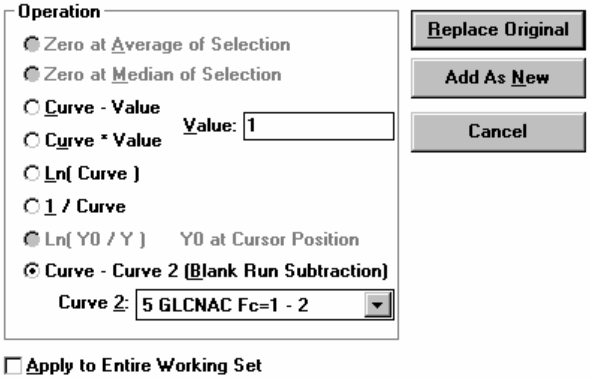
↓



↓

アイコン( )をクリックします。

↓

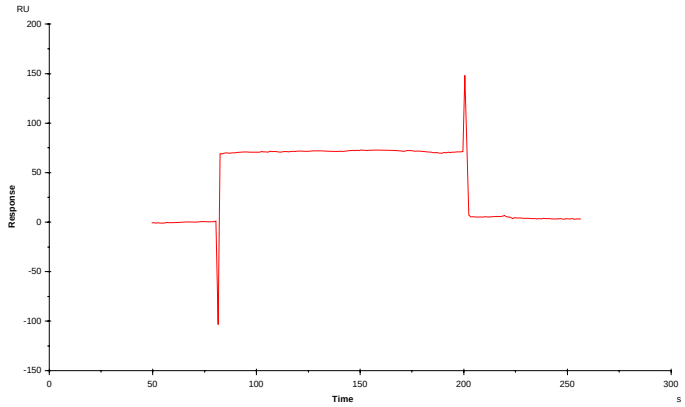


○Curve - Curve2 (Blank Run Subtraction) を選択し、**Curve 2** は差し引くブランクのカーブを選択します。

↓

Replace Original（センサーグラムを書き換える）あるいは **Add As New**（新しいセンサーグラムを作成する）を選択します。

↓



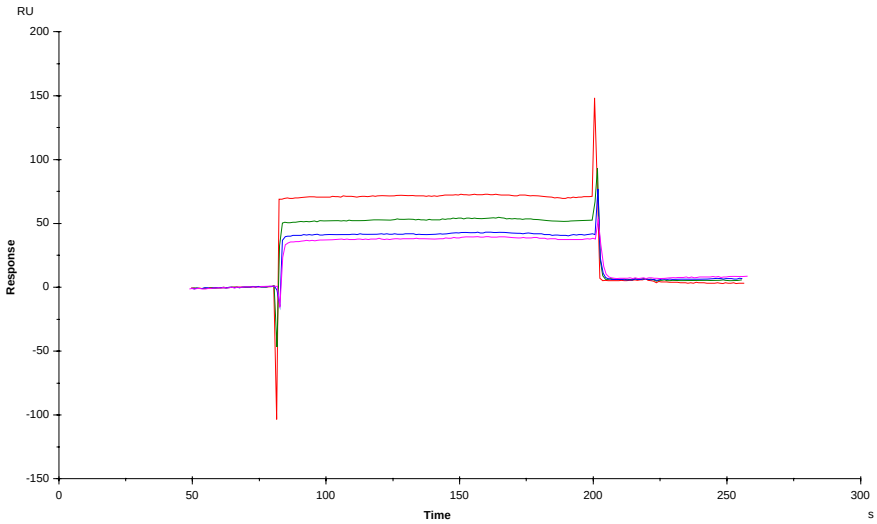
差し引かれたグラフが出来上がります。

(作成されたセンサーグラムは、自動保存されているので、**File → Close** してもかまいません。)

↓

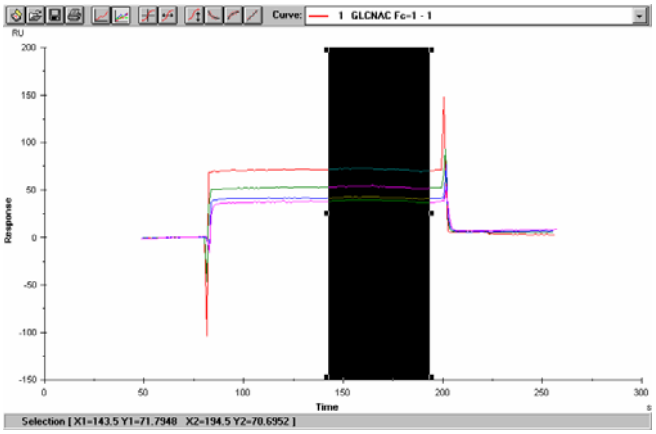
カーブリスト

中のカーブを変更し、それぞれのセンサーグラムからコントロールを差し引き、出来上がったグラフを重ね書きします。



②Average の測定（平衡値 Req の算出）

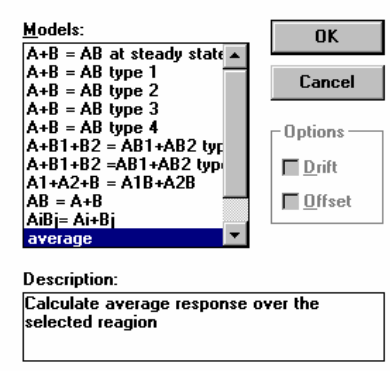
マウス右ボタンをドラッグし、算出する範囲を設定します。



↓

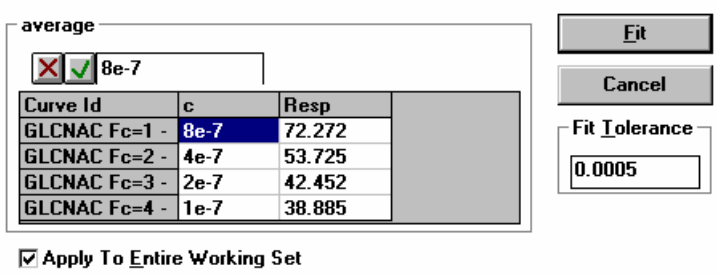
Fit → Non-Linear Fit...をクリックします。

↓



OK をクリックします。

↓



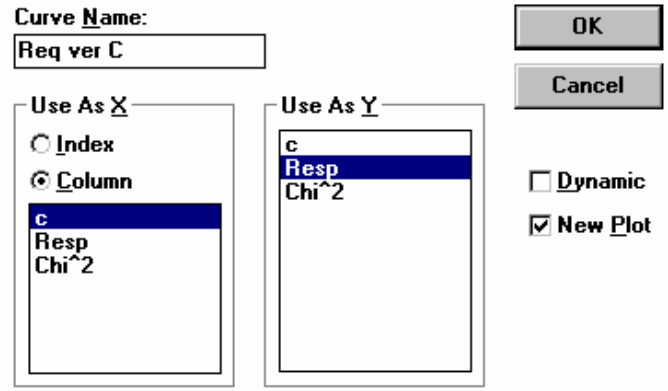
アナライト濃度を入力し、**Fit** をクリックします。

↓

Curve Id	c	Resp	Chi^2
GLCNAC Fc=1 -	1e-7	71.724	0.888
GLCNAC Fc=2 -	2e-7	53.31	0.796
GLCNAC Fc=3 -	4e-7	42.126	0.658
GLCNAC Fc=4 -	8e-7	38.683	0.585

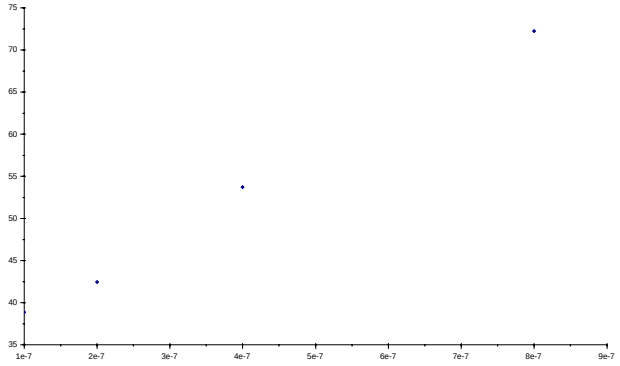
↓

Table → Define Curve...をクリックします。



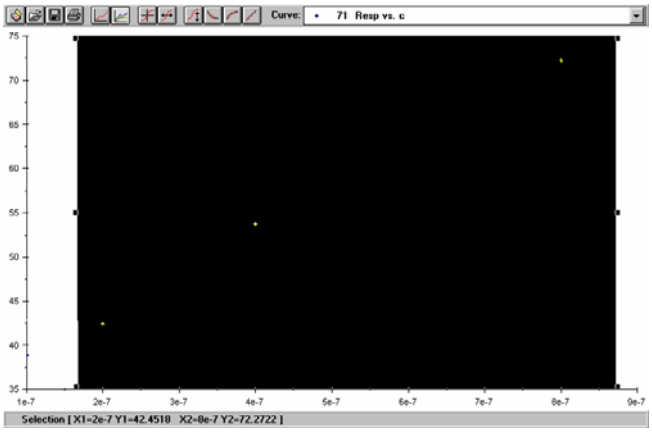
X 軸に **C**、Y 軸に **Resp** を選択し、Curve Name にはカーブの名前（必要な場合のみ）を入力し、**OK** をクリックします。

↓



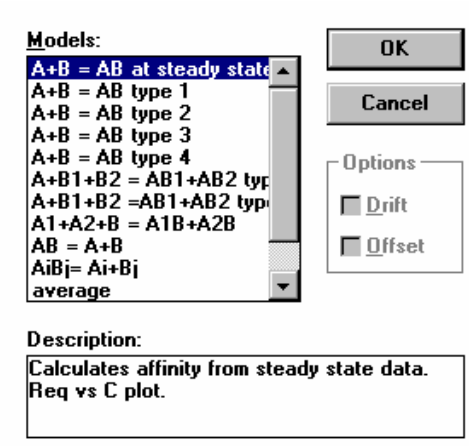
↓

マウス右のボタンをドラッグし、範囲を指定します。（通常は全プロットを選択します。）



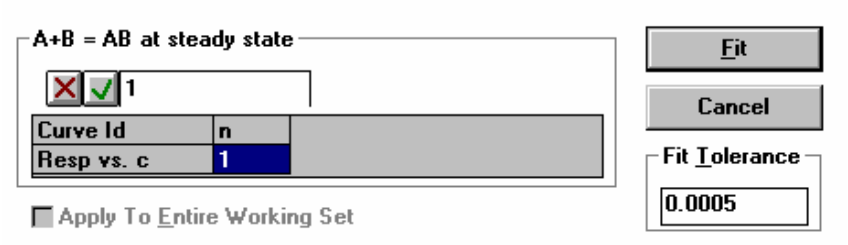
↓

Fit → Non-linear Fit...をクリックします。

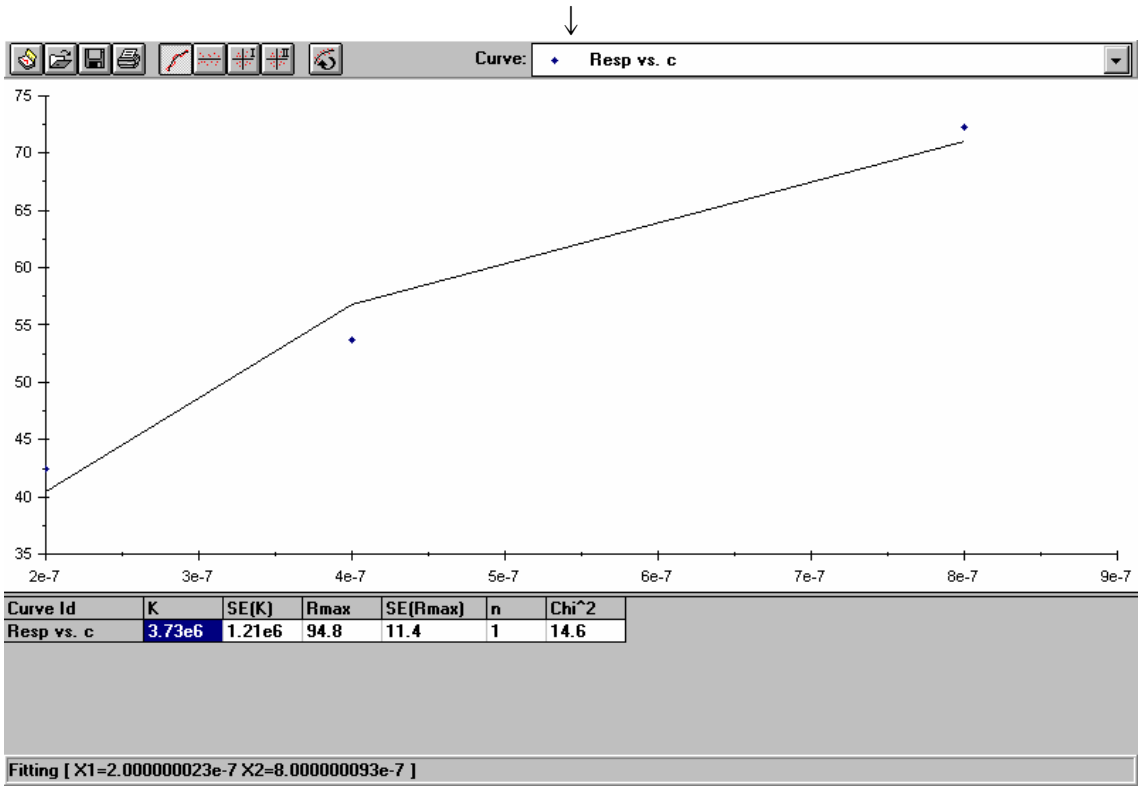


A+B = AB　at steady state を選択し、**OK** をクリックします。

↓



Fit をクリックします。



ここで、結合定数（K_A）は、3.73×10^{-6} M^{-1} となり、解離定数（K_D, $1/K_A$）は、2.7×10^{7} M となります。

4．濃度測定

Biacore は、反応速度論的解析のみならず、濃度測定も可能です。まず、濃度を測定したい物質に特異的に反応する物質をセンサーチップ表面に固定化し、濃度既知のスタンダードで相互作用検討を行い、検量線を作成します。次に、未知濃度のサンプルについて、同様の相互作用検討を行い、レスポンスを測定します。そのレスポンスを検量線と対応させ、濃度を決定します。

4-1. 濃度測定の実験

リガンドの固定化量は、反応速度論的解析の場合のように低く抑える必要はありません。固定化量は多い方が、検量線の直線性は、長い範囲で得られます。固定化量の増加は、NHS/EDC の添加時間を長くすることで調製します。

次に、濃度既知スタンダードと未知濃度サンプルについて相互作用検討を行います。未知濃度のサンプルは、作成する検量線内に入る濃度を予測し、希釈します。濃度予想が困難なサンプルについては、何段階にも希釈します。ここでは、糖蛋白質(アシアロフェツイン)と DSA(チョウセンアサガオレクチン)を例にとり、DSA 濃度の測定について紹介します。DSA は、アシアロフェツインの糖鎖部分を特異的に認識し結合します。プログラム中で、濃度についての KEYWORD の設定を必ず行う必要があります。

(例)

```
KEYWORD   ng/ml       %conc
```

ng/ml は、解析用のソフトウェアで作成される Excel 形式のシート上のカラムタイトルとなります。濃度については、ug/ml や nM、uM 等も使用できます。ただし、プログラムの MAIN ブロック中で濃度を入力する際、単位は省略します。

(濃度測定プロトコール)

```
DEFINE APROG conc
        PARAM          %pos %conc
        KEYWORD        ng/ml    %conc
        CAPTION        Binding of DSA (%conc ng/ml) on Asialofetuin
        FLOW           5
        FLOWPATH       1
 ＊     INJECT         %pos 15                  !Sample
-0:10   RPOINT         Baseline -b
3:20    RPOINT         bound
 ＊     INJECT         R2F3 5                   !regeneration solution
        EXTRACLEAN
1:30    RPOINT         Regeneration
 END

 MAIN
      FLOWCELL         1
      APROG  conc      R2A1     10,000
      APROG  conc      R2A2     5,000
      APROG  conc      R2A3     2,500
      APROG  conc      R2A4     1,250
      APROG  conc      R2A5     625
      APROG  conc      R2B1     uk1/10
      APROG  conc      R2B2     uk1/20
      APROG  conc      R2B1     uk1/10
      APROG  conc      R2B2     uk1/20
      APROG  conc      R2B1     uk1/10
      APROG  conc      R2B2     uk1/20
       APPEND          CONTINUE
 END
```

未知濃度サンプルの濃度入力は、文字列で行います。今回は、uk1/10 等を用いました。 uk1/10 は、濃度が未知 uk (unkown)で、原液を 10 倍希釈したという意味で入力しました。未知濃度サンプルのレスポンスの再現性を確認するために、3 回の測定を繰り返しました。

4-2. 濃度測定解析

①ソフトウェアの起動

以上のプログラムより得られたデータについて、BIAconcentration Evaluation を用いて、未知濃度サンプルの濃度決定を行います。まず、 BIAconcentration Evaluation ソフトウェアを起動させます。

②ファイルの呼び出し

File → Open

目的のファイルを選択し、**OK**(あるいは開く)をクリックします。

BIA Concentration Evaluation - [CONC.RPT]

File Edit Data Window Help

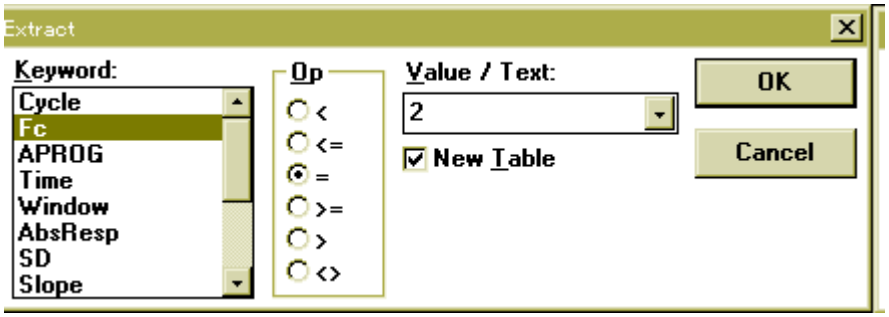
Cycle	APROG	FC	Time	Window	AbsResp	SD	Slope	LRSD	Baseline	RelResp	Id	ng/ml
1	immob	2	284.0	5.0	10127	0.42693	-0.13373	0.38677	YES	0	BASELINE	
1	immob	2	2035.0	5.0	23052	0.63197	0.10028	0.67471	NO	12926	immob_MAb	
2	b2micro	2	65.0	5.0	23051	0.66613	-0.30586	0.45517	YES	0	baseline	high
2	b2micro	2	185.0	5.0	23666	0.82325	-0.35906	0.59927	YES	614	b2micro	high
2	b2micro	2	388.0	5.0	27671	3.38347	-2.02958	0.36530	YES	4006	second_Ab	high
3	b2micro	2	65.0	5.0	23025	0.55899	0.05558	0.58117	YES	0	baseline	high
3	b2micro	2	185.0	5.0	23621	0.66275	-0.25547	0.53724	YES	596	b2micro	high
3	b2micro	2	388.0	5.0	27589	3.96720	-2.38374	0.35373	YES	3968	second_Ab	high
4	b2micro	2	65.5	5.0	22986	0.75142	0.25732	0.65196	YES	0	baseline	273
4	b2micro	2	185.5	5.0	23326	0.42946	0.10575	0.41323	YES	340	b2micro	273
4	b2micro	2	388.0	5.0	25408	2.94728	-1.68242	1.00138	YES	2082	second_Ab	273
5	b2micro	2	65.5	5.0	22986	0.62964	0.05369	0.65703	YES	0	baseline	273
5	b2micro	2	185.5	5.0	23316	0.50330	0.17088	0.43845	YES	330	b2micro	273
5	b2micro	2	388.0	5.0	25383	2.48228	-1.45732	0.59753	YES	2068	second_Ab	273
6	b2micro	2	65.0	5.0	22965	0.72404	0.09957	0.74310	YES	0	baseline	low
6	b2micro	2	185.0	5.0	23159	0.56763	-0.08029	0.58164	YES	194	b2micro	low
6	b2micro	2	388.0	5.0	24156	1.63845	-0.94279	0.51659	YES	997	second_Ab	low
7	b2micro	2	65.5	5.0	22915	0.69844	0.08928	0.71949	YES	0	baseline	0
7	b2micro	2	185.5	5.0	22922	0.43176	0.00469	0.45504	YES	8	b2micro	0
7	b2micro	2	388.0	5.0	22999	0.66538	-0.04439	0.69707	YES	77	second_Ab	0
8	b2micro	2	65.0	5.0	22887	0.59952	0.07695	0.61746	YES	0	baseline	1040
8	b2micro	2	185.0	5.0	23440	0.69767	-0.16346	0.67764	YES	553	b2micro	1040
8	b2micro	2	387.0	5.0	27662	3.67097	-2.19450	0.50832	YES	4222	second_Ab	1040
9	b2micro	2	65.5	5.0	22892	0.33230	0.06165	0.33329	YES	0	baseline	130

③データの抽出

各カラム内には、濃度測定解析に不必要な情報(Fc カラム内でのリガンドが固定化されていないフローセルや Id カラム内での BASELINE 等)が含まれます。そこで、次に、各カラム内での情報の抽出を行います。

Data → Extract

Keyword の項目には、テーブル内でのカラムタイトルが表示されています。従って、 Keyword の項目を選択すると、選択されたカラム内での情報の抽出が可能となります。今回、Keyword を Fc に、 Value/Text:を 2 に▼を使って設定し、**OK** をクリックします。



上記と同様の操作(**Data → Extract**)を行います。Keyword を Id(カラム)に、Value/Text:を bound に▼を使って設定し、**OK** をクリックします。

BIA Concentration Evaluation - [ASSAY3.BLR* : boundDSA]

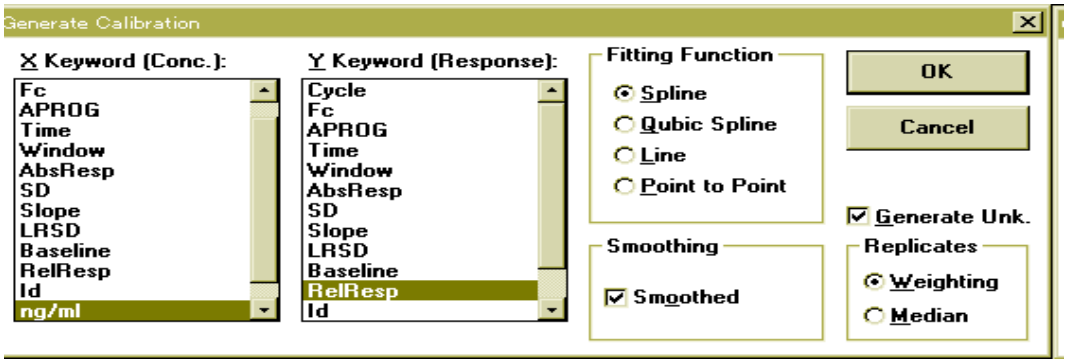
File Edit Data Window Help

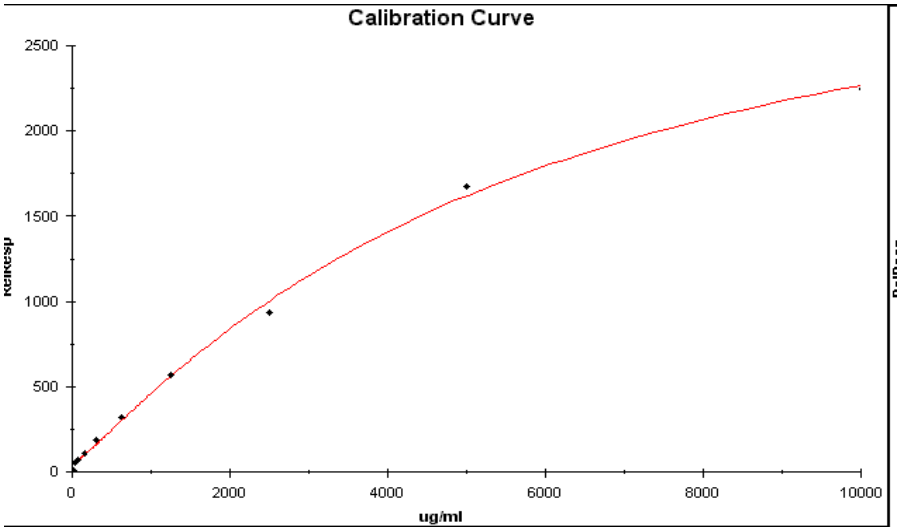
Cycle	Fc	APROG	Time	Window	AbsResp	SD	Slope	LRSD	Baseline	RelResp	Id	ng/ml	sample
1	2	assay	256.6	5.0	29020.8	18.74	-10.01	0.45	No	2436.0	boundDSA	10,000	DSA
2	2	assay	255.6	5.0	28507.6	10.38	-5.55	0.14	No	1887.9	boundDSA	5,000	DSA
3	2	assay	255.6	5.0	27782.5	3.20	-1.70	0.41	No	1158.4	boundDSA	2,500	DSA
4	2	assay	255.6	5.0	27239.7	0.76	-0.35	0.43	No	652.7	boundDSA	1,250	DSA
5	2	assay	255.6	5.0	26883.2	0.55	-0.16	0.51	No	346.3	boundDSA	625	DSA
6	2	assay	255.6	5.0	29177.8	19.14	-10.23	0.47	No	2683.2	boundDSA	10,000	DSA
7	2	assay	255.6	5.0	28540.0	10.41	-5.56	0.38	No	1872.8	boundDSA	5,000	DSA
8	2	assay	255.6	5.0	27827.6	3.57	-1.90	0.38	No	1203.8	boundDSA	2,500	DSA
9	2	assay	255.6	5.0	27238.8	0.93	-0.44	0.49	No	663.1	boundDSA	1,250	DSA
10	2	assay	255.6	5.0	26864.6	0.13	0.01	0.14	No	340.5	boundDSA	625	DSA
11	2	assay	255.6	5.0	29205.3	19.86	-10.61	0.82	No	2734.0	boundDSA	10,000	DSA
12	2	assay	256.6	5.0	28546.3	10.34	-5.52	0.29	No	1869.3	boundDSA	5,000	DSA
13	2	assay	256.6	5.0	27858.6	3.77	-2.01	0.17	No	1222.3	boundDSA	2,500	DSA
14	2	assay	256.6	5.0	27259.2	0.98	-0.51	0.23	No	669.8	boundDSA	1,250	DSA
15	2	assay	255.6	5.0	26902.9	0.19	-0.07	0.16	No	366.4	boundDSA	625	DSA
16	2	assay	255.6	5.0	26484.4	0.34	0.10	0.31	No	-7.5	boundDSA	10,000	IgG
17	2	assay	255.6	5.0	26430.5	0.26	0.08	0.24	No	-7.1	boundDSA	5,000	IgG
18	2	assay	255.6	5.0	26404.6	0.28	0.04	0.30	No	-6.2	boundDSA	2,500	IgG
19	2	assay	256.6	5.0	26396.6	0.16	0.00	0.18	No	-7.0	boundDSA	1,250	IgG
20	2	assay	256.6	5.0	26379.0	0.33	0.06	0.35	No	-4.5	boundDSA	625	IgG
21	2	assay	256.6	5.0	26361.3	0.36	0.01	0.41	No	-8.6	boundDSA	10,000	IgG
22	2	assay	256.6	5.0	26350.0	0.24	0.07	0.22	No	-7.5	boundDSA	5,000	IgG
23	2	assay	256.6	5.0	26339.8	0.20	0.02	0.22	No	-6.5	boundDSA	2,500	IgG
24	2	assay	256.6	5.0	26343.2	0.27	-0.01	0.30	No	-6.8	boundDSA	1,250	IgG

④検量線の作成

Data → Generate Calibration

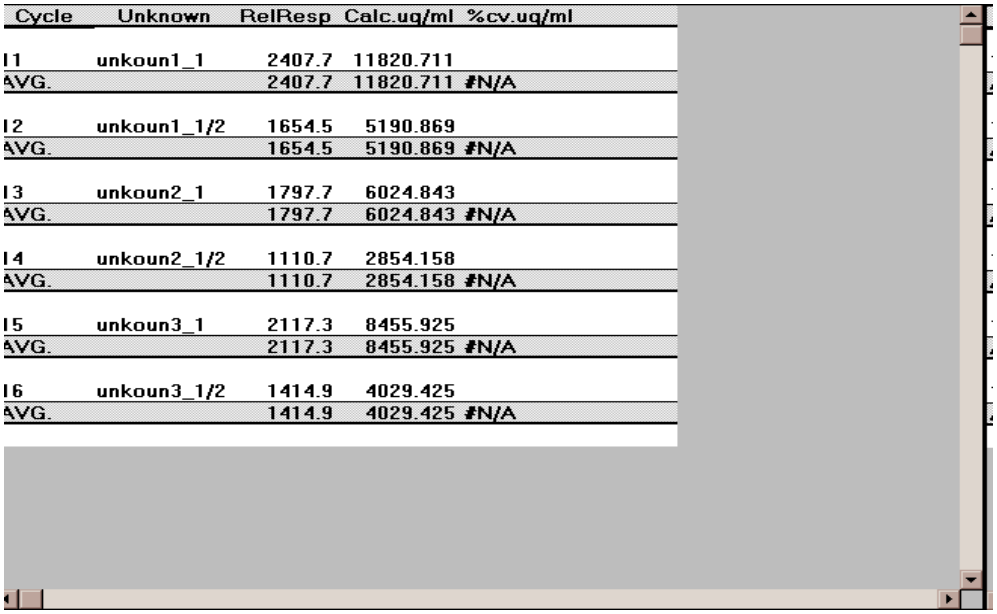
X Keyword を濃度(ug/ml 等)に、 Y Keyword を RelResp に設定し、**OK** をクリックすると、Calibration Curve が作成されます。





⑤未知濃度の算出

サンプル濃度の算出は、グラフ左の をクリックします。



Cycle	Unknown	RelResp	Calc.ug/ml	%cv.ug/ml
11	unkoun1_1	2407.7	11820.711	
AVG.		2407.7	11820.711	#N/A
12	unkoun1_1/2	1654.5	5190.869	
AVG.		1654.5	5190.869	#N/A
13	unkoun2_1	1797.7	6024.843	
AVG.		1797.7	6024.843	#N/A
14	unkoun2_1/2	1110.7	2854.158	
AVG.		1110.7	2854.158	#N/A
15	unkoun3_1	2117.3	8455.925	
AVG.		2117.3	8455.925	#N/A
16	unkoun3_1/2	1414.9	4029.425	
AVG.		1414.9	4029.425	#N/A

サンプルの濃度は、Calc.ug/ml(濃度)に表示されます。これは、各サンプルからのレスポンス(RelResp)を検量線に対応させて、算出された値です。また、同一サンプルの相互作用検討を複数回行った場合(プログラム中で、同一文字列で表示されているものが複数個ある場合)、AVG.として平均値が、%CV として CV 値が表示されます。

4-3. 複数セル同時濃度測定

①プロトコール

サンプル中の複数の成分(最大 4 個)について、濃度測定を行いたい場合も、基本的な操作は、以上と同様です。センサーチップは、それぞれの成分に特異的に反応を示す物質をフローセルにそれぞれ固定化したものを使用します。そこにマルチチャンネルで、各成分のスタンダードとサンプルを順次添加します。ここでは、サンプル中の 3 つの成分(DSA,IgG,AFP)の濃度同時測定を例にとり、プログラムを紹介します。複数個同時濃度測定プロトコールでは、未知濃度のサンプル名は、統一させる必要があります。サンプル番号や希釈倍率は、サンプル濃度の項目で、文字列を用いて設定します。今回は、未知濃度のサンプル名に、Sample という表示を用いました。また、濃度の入力には、uk1-1/10 等を用いました。 uk1-1/10 は、濃度が未知 uk (unkown)のサンプル 1 番についての測定で、その原液を 10 倍希釈したものという意味で入力しました。レスポンスの再現性

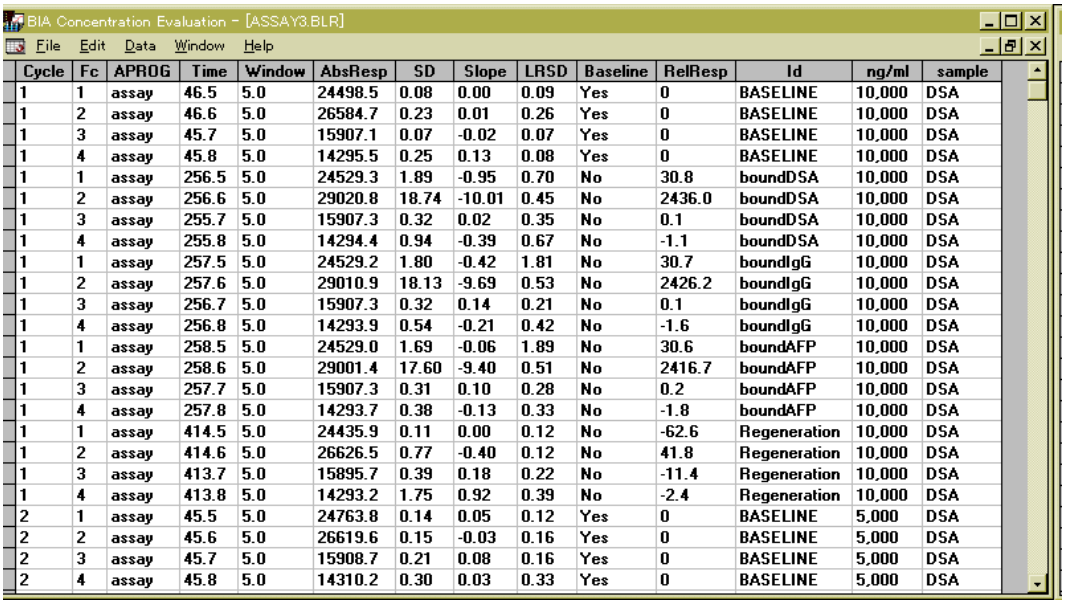
を確認するために、2 回の測定を繰り返しました。

```
DEFINE APROG conc
        PARAM       %pos %ID %conc
        KEYWORD     sample %ID
        KEYWORD     ng/ml    %conc
       CAPTION      Binding of %ID(%conc)
       FLOW         5
 *     INJECT       %pos 15                 !Sample
-0:10  RPOINT       Baseline -b
3:20   RPOINT       bound
 *     INJECT       R2F3 5                  !regeneration solution
1:30   RPOINT       Regeneration
 END

 MAIN
      FLOWCELL      1,2,3,4
      APROG  conc   R2A1   DSA        10,000
      APROG  conc   R2A2   DSA        5,000
      APROG  conc   R2A3   DSA        2,500
      APROG  conc   R2A4   DSA        1,250
      APROG  conc   R2B1   IgG        10,000
      APROG  conc   R2B2   IgG        5,000
      APROG  conc   R2B3   IgG        2,500
      APROG  conc   R2B4   IgG        1,250
      APROG  conc   R2C1   AFP        10,000
      APROG  conc   R2C2   AFP        5,000
      APROG  conc   R2C3   AFP        2,500
      APROG  conc   R2C4   AFP        1,250
      APROG  conc   R2D1   Sample     uk1-1/10
      APROG  conc   R2D2   Sample     uk1-1/20
      APROG  conc   R2D3   Sample     uk2-1/10
      APROG  conc   R2D4   Sample     uk2-1/20
      APROG  conc   R2D5   Sample     uk3-1/10
      APROG  conc   R2D6   Sample     uk3-1/20
       APPEND       CONTINUE
 END
```

②解析方法

BIAconcentration Evaluation ソフトウェアを起動やファイルの開き方は、1-1,1-2 を参照してください。



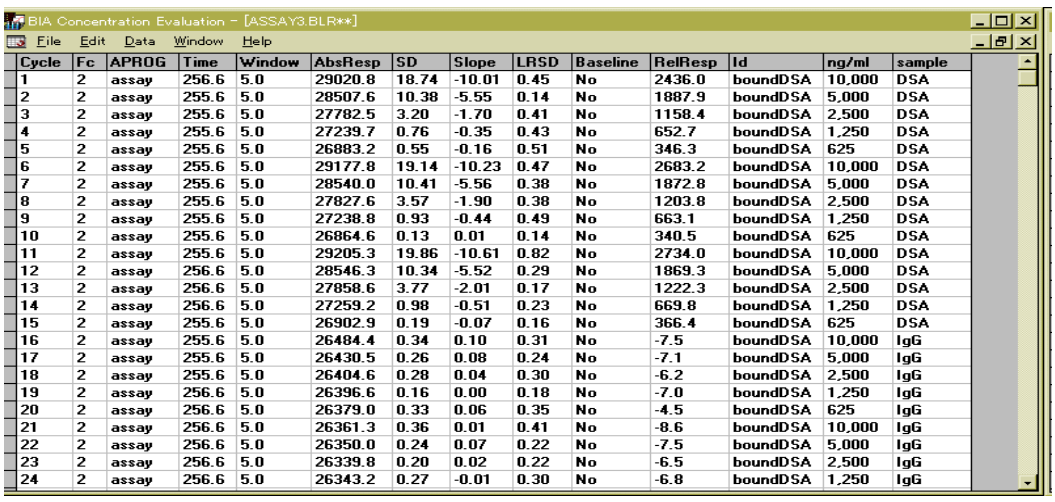
BIA Concentration Evaluation - [ASSAY3.BLR]

File Edit Data Window Help

Cycle	Fc	APROG	Time	Window	AbsResp	SD	Slope	LRSD	Baseline	RelResp	Id	ng/ml	sample
1	1	assay	46.5	5.0	24498.5	0.08	0.00	0.09	Yes	0	BASELINE	10,000	DSA
1	2	assay	46.6	5.0	26584.7	0.23	0.01	0.26	Yes	0	BASELINE	10,000	DSA
1	3	assay	45.7	5.0	15907.1	0.07	-0.02	0.07	Yes	0	BASELINE	10,000	DSA
1	4	assay	45.8	5.0	14295.5	0.25	0.13	0.08	Yes	0	BASELINE	10,000	DSA
1	1	assay	256.5	5.0	24529.3	1.89	-0.95	0.70	No	30.8	boundDSA	10,000	DSA
1	2	assay	256.6	5.0	29020.8	18.74	-10.01	0.45	No	2436.0	boundDSA	10,000	DSA
1	3	assay	255.7	5.0	15907.3	0.32	0.02	0.35	No	0.1	boundDSA	10,000	DSA
1	4	assay	255.8	5.0	14294.4	0.94	-0.39	0.67	No	-1.1	boundDSA	10,000	DSA
1	1	assay	257.5	5.0	24529.2	1.80	-0.42	1.81	No	30.7	boundIgG	10,000	DSA
1	2	assay	257.6	5.0	29010.9	18.13	-9.69	0.53	No	2426.2	boundIgG	10,000	DSA
1	3	assay	256.7	5.0	15907.3	0.32	0.14	0.21	No	0.1	boundIgG	10,000	DSA
1	4	assay	256.8	5.0	14293.9	0.54	-0.21	0.42	No	-1.6	boundIgG	10,000	DSA
1	1	assay	258.5	5.0	24529.0	1.69	-0.06	1.89	No	30.6	boundAFP	10,000	DSA
1	2	assay	258.6	5.0	29001.4	17.60	-9.40	0.51	No	2416.7	boundAFP	10,000	DSA
1	3	assay	257.7	5.0	15907.3	0.31	0.10	0.28	No	0.2	boundAFP	10,000	DSA
1	4	assay	257.8	5.0	14293.7	0.38	-0.13	0.33	No	-1.8	boundAFP	10,000	DSA
1	1	assay	414.5	5.0	24435.9	0.11	0.00	0.12	No	-62.6	Regeneration	10,000	DSA
1	2	assay	414.6	5.0	26626.5	0.77	-0.40	0.12	No	41.8	Regeneration	10,000	DSA
1	3	assay	413.7	5.0	15895.7	0.39	0.18	0.22	No	-11.4	Regeneration	10,000	DSA
1	4	assay	413.8	5.0	14293.2	1.75	0.92	0.39	No	-2.4	Regeneration	10,000	DSA
2	1	assay	45.5	5.0	24763.8	0.14	0.05	0.12	Yes	0	BASELINE	5,000	DSA
2	2	assay	45.6	5.0	26619.6	0.15	-0.03	0.16	Yes	0	BASELINE	5,000	DSA
2	3	assay	45.7	5.0	15908.7	0.21	0.08	0.16	Yes	0	BASELINE	5,000	DSA
2	4	assay	45.8	5.0	14310.2	0.30	0.03	0.33	Yes	0	BASELINE	5,000	DSA

一つ一つの成分について、1-3 を参考に必要な情報を選択していきます。

まず、サンプル中の DSA 成分について、濃度測定をする場合、Fc の項目はアシアロフェツインが固定化されているセルに、Id の項目は bound に設定します。



BIA Concentration Evaluation - [ASSAY3.BLR**]

File Edit Data Window Help

Cycle	Fc	APROG	Time	Window	AbsResp	SD	Slope	LRSD	Baseline	RelResp	Id	ng/ml	sample
1	2	assay	256.6	5.0	29020.8	18.74	-10.01	0.45	No	2436.0	boundDSA	10,000	DSA
2	2	assay	255.6	5.0	28507.6	10.38	-5.55	0.14	No	1887.9	boundDSA	5,000	DSA
3	2	assay	255.6	5.0	27782.5	3.20	-1.70	0.41	No	1158.4	boundDSA	2,500	DSA
4	2	assay	255.6	5.0	27239.7	0.76	-0.35	0.43	No	652.7	boundDSA	1,250	DSA
5	2	assay	255.6	5.0	26883.2	0.55	-0.16	0.51	No	346.3	boundDSA	625	DSA
6	2	assay	255.6	5.0	29177.8	19.14	-10.23	0.47	No	2683.2	boundDSA	10,000	DSA
7	2	assay	255.6	5.0	28540.0	10.41	-5.56	0.38	No	1872.8	boundDSA	5,000	DSA
8	2	assay	255.6	5.0	27827.6	3.57	-1.90	0.38	No	1203.8	boundDSA	2,500	DSA
9	2	assay	255.6	5.0	27238.8	0.93	-0.44	0.49	No	663.1	boundDSA	1,250	DSA
10	2	assay	255.6	5.0	26864.6	0.13	0.01	0.14	No	340.5	boundDSA	625	DSA
11	2	assay	255.6	5.0	29205.3	19.86	-10.61	0.82	No	2734.0	boundDSA	10,000	DSA
12	2	assay	256.6	5.0	28546.3	10.34	-5.52	0.29	No	1869.3	boundDSA	5,000	DSA
13	2	assay	256.6	5.0	27858.6	3.77	-2.01	0.17	No	1222.3	boundDSA	2,500	DSA
14	2	assay	256.6	5.0	27259.2	0.98	-0.51	0.23	No	669.8	boundDSA	1,250	DSA
15	2	assay	255.6	5.0	26902.9	0.19	-0.07	0.16	No	366.4	boundDSA	625	DSA
16	2	assay	255.6	5.0	26484.4	0.34	0.10	0.31	No	-7.5	boundDSA	10,000	IgG
17	2	assay	255.6	5.0	26430.5	0.26	0.08	0.24	No	-7.1	boundDSA	5,000	IgG
18	2	assay	255.6	5.0	26404.6	0.28	0.04	0.30	No	-6.2	boundDSA	2,500	IgG
19	2	assay	256.6	5.0	26396.6	0.16	0.00	0.18	No	-7.0	boundDSA	1,250	IgG
20	2	assay	256.6	5.0	26379.0	0.33	0.06	0.35	No	-4.5	boundDSA	625	IgG
21	2	assay	256.6	5.0	26361.3	0.36	0.01	0.41	No	-8.6	boundDSA	10,000	IgG
22	2	assay	256.6	5.0	26350.0	0.24	0.07	0.22	No	-7.5	boundDSA	5,000	IgG
23	2	assay	256.6	5.0	26339.8	0.20	0.02	0.22	No	-6.5	boundDSA	2,500	IgG
24	2	assay	256.6	5.0	26343.2	0.27	-0.01	0.30	No	-6.8	boundDSA	1,250	IgG

次に、Sample の項目について、DSA 濃度算出に不必要な情報をすべて削除します。**Edit Mode** を用いると、カラム中のある設定範囲のカラムもしくは行について削除することが可能です。

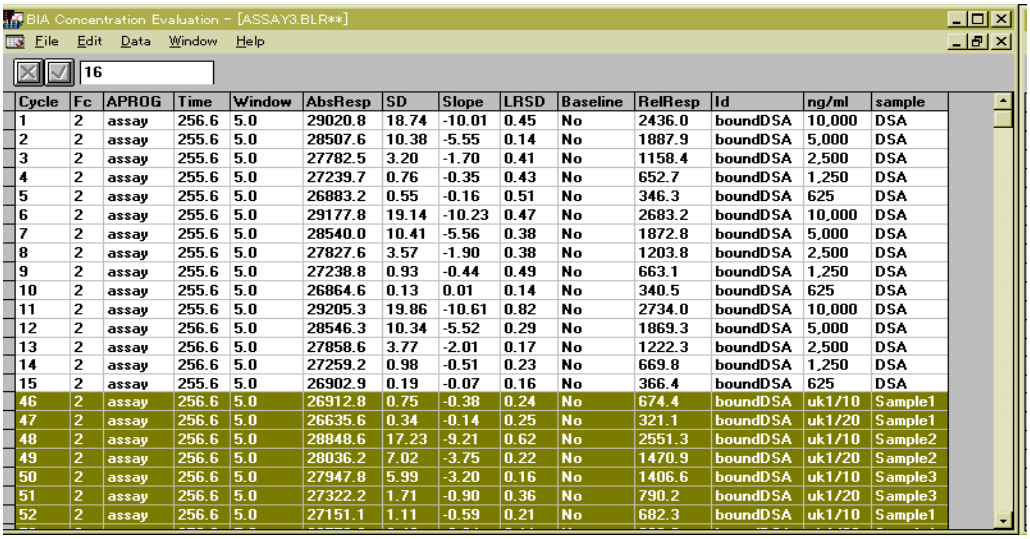
Edit → Edit Mode

今回は以下のように、シート上の左端をドラッグし、DSA と Sample 以外の行を選択します。(選択したい範囲が連続していない場合は、選択□削除の操作を繰り返し行います。)

Cycle	Fc	APROG	Time	Window	AbsResp	SD	Slope	LRSD	Baseline	RelResp	Id	ng/ml	sample
1	2	assay	256.6	5.0	29020.8	18.74	-10.01	0.45	No	2436.0	boundDSA	10,000	DSA
2	2	assay	255.6	5.0	28507.6	10.38	-5.55	0.14	No	1887.9	boundDSA	5,000	DSA
3	2	assay	255.6	5.0	27782.5	3.20	-1.70	0.41	No	1158.4	boundDSA	2,500	DSA
4	2	assay	255.6	5.0	27239.7	0.76	-0.35	0.43	No	652.7	boundDSA	1,250	DSA
5	2	assay	255.6	5.0	26883.2	0.55	-0.16	0.51	No	346.3	boundDSA	625	DSA
6	2	assay	255.6	5.0	29177.8	19.14	-10.23	0.47	No	2683.2	boundDSA	10,000	DSA
7	2	assay	255.6	5.0	28540.0	10.41	-5.56	0.38	No	1872.8	boundDSA	5,000	DSA
8	2	assay	255.6	5.0	27827.6	3.57	-1.90	0.38	No	1203.8	boundDSA	2,500	DSA
9	2	assay	255.6	5.0	27238.8	0.93	-0.44	0.49	No	663.1	boundDSA	1,250	DSA
10	2	assay	255.6	5.0	26864.6	0.13	0.01	0.14	No	340.5	boundDSA	625	DSA
11	2	assay	255.6	5.0	29205.3	19.86	-10.61	0.82	No	2734.0	boundDSA	10,000	DSA
12	2	assay	256.6	5.0	28546.3	10.34	-5.52	0.29	No	1869.3	boundDSA	5,000	DSA
13	2	assay	256.6	5.0	27858.6	3.77	-2.01	0.17	No	1222.3	boundDSA	2,500	DSA
14	2	assay	256.6	5.0	27259.2	0.98	-0.51	0.23	No	669.8	boundDSA	1,250	DSA
15	2	assay	255.6	5.0	26902.9	0.19	-0.07	0.16	No	366.4	boundDSA	625	DSA
16	2	assay	255.6	5.0	26484.4	0.34	0.10	0.31	No	-7.5	boundDSA	10,000	IgG
17	2	assay	255.6	5.0	26430.5	0.26	0.08	0.24	No	-7.1	boundDSA	5,000	IgG
18	2	assay	255.6	5.0	26404.6	0.28	0.04	0.30	No	-6.2	boundDSA	2,500	IgG
19	2	assay	256.6	5.0	26396.6	0.16	0.00	0.18	No	-7.0	boundDSA	1,250	IgG
20	2	assay	256.6	5.0	26379.0	0.33	0.06	0.35	No	-4.5	boundDSA	625	IgG
21	2	assay	256.6	5.0	26361.3	0.36	0.01	0.41	No	-8.6	boundDSA	10,000	IgG
22	2	assay	256.6	5.0	26350.0	0.24	0.07	0.22	No	-7.5	boundDSA	5,000	IgG
23	2	assay	256.6	5.0	26339.8	0.20	0.02	0.22	No	-6.5	boundDSA	2,500	IgG
24	2	assay	256.6	5.0	26343.2	0.27	-0.01	0.30	No	-6.8	boundDSA	1,250	IgG

Edit → Delete

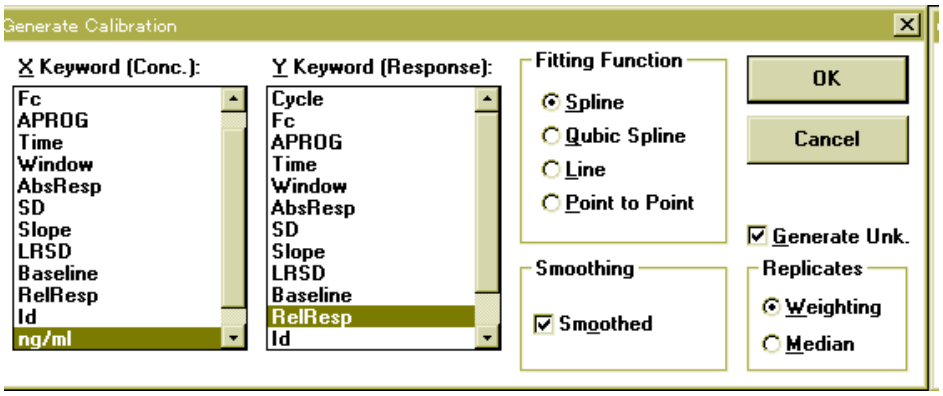
そのまま **OK** をクリックします。

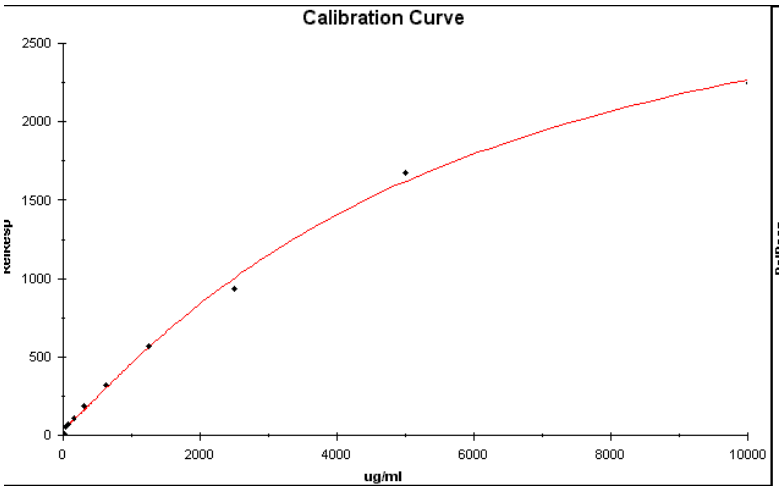


Cycle	Fc	APROG	Time	Window	AbsResp	SD	Slope	LRSD	Baseline	RelResp	Id	ng/ml	sample
1	2	assay	256.6	5.0	29020.8	18.74	-10.01	0.45	No	2436.0	boundDSA	10,000	DSA
2	2	assay	255.6	5.0	28507.6	10.38	-5.55	0.14	No	1887.9	boundDSA	5,000	DSA
3	2	assay	255.6	5.0	27782.5	3.20	-1.70	0.41	No	1158.4	boundDSA	2,500	DSA
4	2	assay	255.6	5.0	27239.7	0.76	-0.35	0.43	No	652.7	boundDSA	1,250	DSA
5	2	assay	255.6	5.0	26883.2	0.55	-0.16	0.51	No	346.3	boundDSA	625	DSA
6	2	assay	255.6	5.0	29177.8	19.14	-10.23	0.47	No	2683.2	boundDSA	10,000	DSA
7	2	assay	255.6	5.0	28540.0	10.41	-5.56	0.38	No	1872.8	boundDSA	5,000	DSA
8	2	assay	255.6	5.0	27827.6	3.57	-1.90	0.38	No	1203.8	boundDSA	2,500	DSA
9	2	assay	255.6	5.0	27238.8	0.93	-0.44	0.49	No	663.1	boundDSA	1,250	DSA
10	2	assay	255.6	5.0	26864.6	0.13	0.01	0.14	No	340.5	boundDSA	625	DSA
11	2	assay	255.6	5.0	29205.3	19.86	-10.61	0.82	No	2734.0	boundDSA	10,000	DSA
12	2	assay	256.6	5.0	28546.3	10.34	-5.52	0.29	No	1869.3	boundDSA	5,000	DSA
13	2	assay	256.6	5.0	27858.6	3.77	-2.01	0.17	No	1222.3	boundDSA	2,500	DSA
14	2	assay	256.6	5.0	27259.2	0.98	-0.51	0.23	No	669.8	boundDSA	1,250	DSA
15	2	assay	255.6	5.0	26902.9	0.19	-0.07	0.16	No	366.4	boundDSA	625	DSA
46	2	assay	256.6	5.0	26912.8	0.75	-0.38	0.24	No	674.4	boundDSA	uk1/10	Sample1
47	2	assay	256.6	5.0	26635.6	0.34	-0.14	0.25	No	321.1	boundDSA	uk1/20	Sample1
48	2	assay	256.6	5.0	28848.6	17.23	-9.21	0.62	No	2551.3	boundDSA	uk1/10	Sample2
49	2	assay	256.6	5.0	28036.2	7.02	-3.75	0.22	No	1470.9	boundDSA	uk1/20	Sample2
50	2	assay	256.6	5.0	27947.8	5.99	-3.20	0.16	No	1406.6	boundDSA	uk1/10	Sample3
51	2	assay	256.6	5.0	27322.2	1.71	-0.90	0.36	No	790.2	boundDSA	uk1/20	Sample3
52	2	assay	256.6	5.0	27151.1	1.11	-0.59	0.21	No	682.3	boundDSA	uk1/10	Sample1

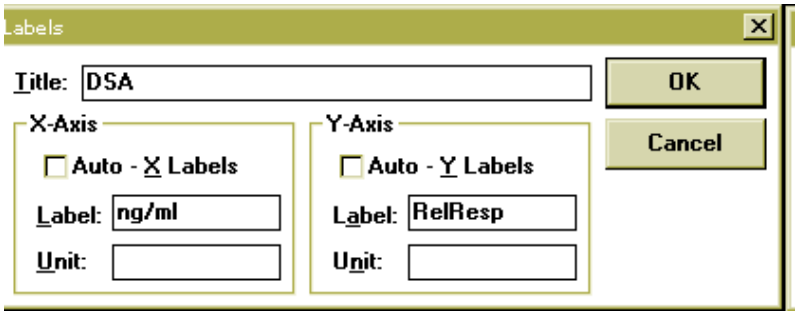
Data → Generate Calibration

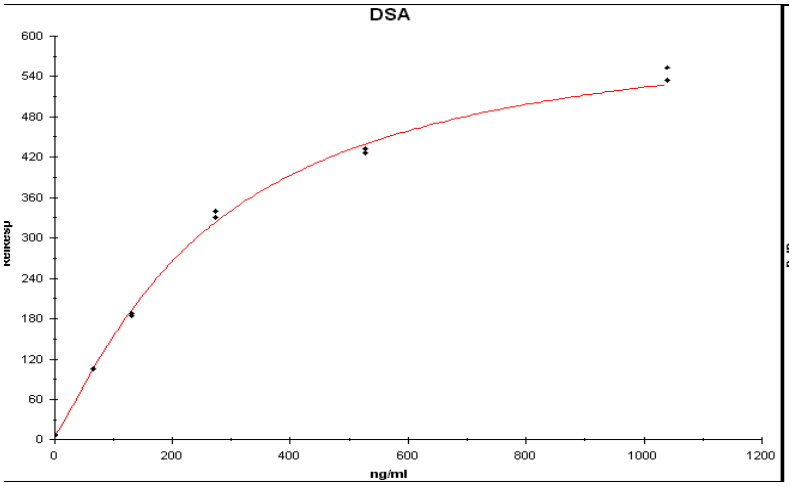
X Keyword を濃度(ng/ml 等)に、 Y Keyword を RelResp に設定し、**OK** をクリックすると、Calibration Curve が作成されます。





View → Label でこの検量線グラフ上部のタイトルを Calibration Curve から変更できます。今回は、Title:に DSA と入力して、**OK** をクリックします。





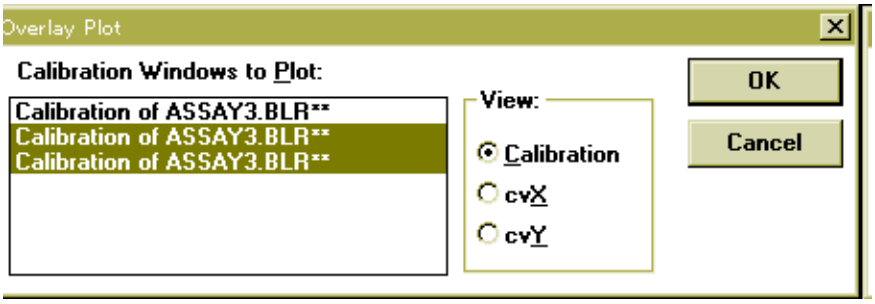
濃度未知のサンプル濃度の算出は、グラフ左の

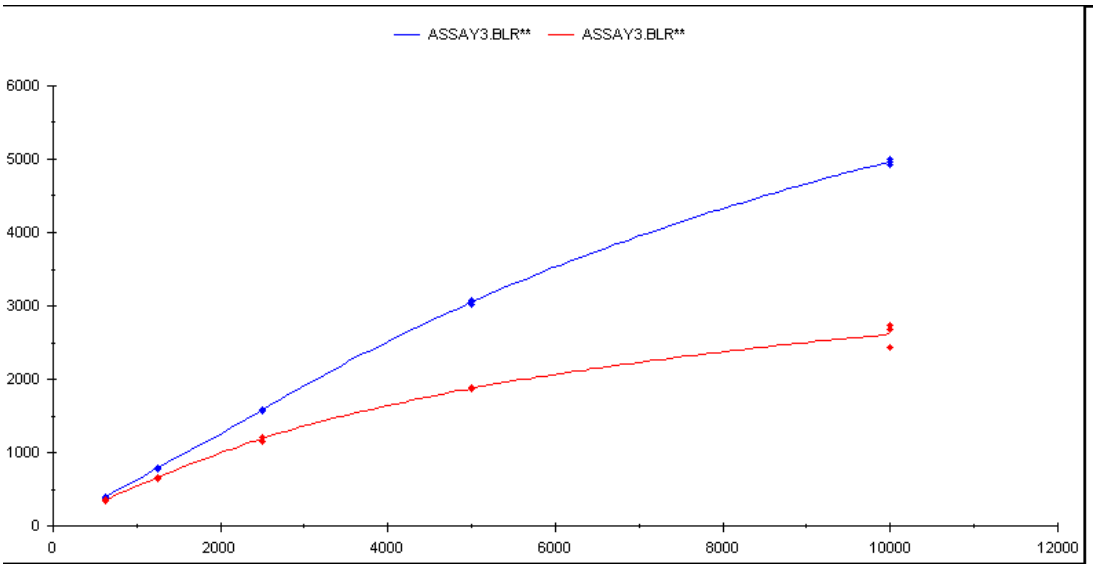
をクリックします。

Cycle	Unknown	RelResp	Calc.ng/ml	%cv.ng/ml
46	uk1-1/10	674.4	1267.075	
46	uk1-1/10	674	1266.236	
46	uk1-1/10	673.7	1265.607	
52	uk1-1/10	682.3	1283.679	
52	uk1-1/10	681.7	1282.416	
52	uk1-1/10	681.2	1281.364	
58	uk1-1/10	676.7	1271.904	
58	uk1-1/10	676.1	1270.644	
58	uk1-1/10	675.4	1269.174	
AVG.		677.2777778	1273.122	0.58
47	uk1-1/20	321	570.378	
47	uk1-1/20	321	570.378	
47	uk1-1/20	321.1	570.566	
53	uk1-1/20	336.6	599.785	
53	uk1-1/20	336.5	599.596	
53	uk1-1/20	336.3	599.219	
59	uk1-1/20	326.9	581.492	
59	uk1-1/20	327	581.681	
59	uk1-1/20	327.3	582.246	
AVG.		328.1888889	583.927	2.17
48	uk2-1/10	2551.3	10029.204	
48	uk2-1/10	2542.1	9923.957	

次に、Menu bar 中の **Window → ファイル名**を選択し、一番はじめのテーブルに戻ります。サンプル中の別成分についても、以上と同様の方法で濃度測定を行います。

また、一つの検量線を開いている状態で、**Data → Overlay Plot** をクリックすると、一つのデータから作成された複数の検量線を重ね書きすることができます。重ね書きしたい検量線を選択し、**OK** をクリックします。





濃度測定の実験を行う上での注意点
①固定化量は多くする。
②検量線は、直線性のあるできるだけ広い濃度範囲で作成する。
③未知濃度のサンプルの分析は、2 段階以上の希釈倍率で行う。

安全上のご注意

必ずお守りください

このしおりには、弊社機器に関する一般的な注意事項を記載しています。取扱いの詳細は必ず製品添付の使用説明書をご覧ください。

誤った取扱いをした場合に生じる危険や損害の程度を、次の区分で説明しています。

警告　誤った取扱いをした場合に、死亡や重傷を負う可能性があるもの。

注意　誤った取扱いをした場合に、傷害または物的損害が発生する可能性があるもの。

図記号の意味は次の通りです。

禁止　⃠は、してはいけない「禁止」を示します。

❗は、必ず実行していただく「強制」を示します。

警告

禁止

電源プラグの抜き差しにより、運転を停止しない

火災・感電の原因になります。

禁止

電源コードを途中で接続しない、タコ足配線をしない

火災・感電・故障の原因になります。

禁止

電源コード・電源プラグを傷つけない

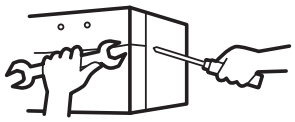
●加工しない　●束ねない　●ねじらない
●折らない　●物をのせない　●加熱しない
●無理に曲げない

破損して火災・感電の原因になります。

禁止

修理・分解・改造はしない

火災・感電の原因になります。



根元まで差込む

電源プラグのほこりを取り除き、刃の根元まで確実に差込む

接続が不十分だと、隙間にほこりが付着して火災・感電の原因になります。

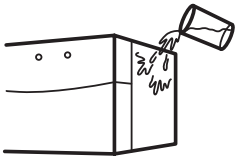
指定の規格

取扱説明書に指定された規格のコンセントを使用する

指定された規格以外で使用すると火災・感電の原因になります。

禁止

本体を水につけたり、水をかけたりしない



ショート・感電の原因になります。

禁止

電源コードや電源プラグが傷んだり、コンセントの差し込みがゆるいときは使わない

感電・ショート・発火の原因になります。

禁止

使用時や使用直後（運転停止後約60分間）は、操作に関係のない部位には触れない

高温部に触れ、やけどの原因になります。

プラグを抜く

異常時は、運転を停止して電源プラグを抜く

異常のまま運転を続けると火災・感電の原因になります。

禁止

同梱の電源コード・電源プラグ以外のコード・プラグを使用しない

故障・火災・感電の原因になります。

禁止

同梱の電源コード・電源プラグを他の電気機器に使用しない

故障・火災・感電の原因になります。

⚠ 注意

禁 止

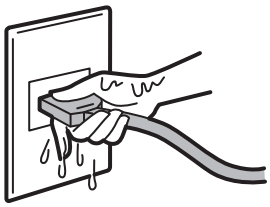
設置時は、次のような場所には置かない

●不安定な場所　●湿気やほこりの多い場所
●油煙や湯気が当たる場所
●直射日光の当たる場所　●風雨のあたる場所
●熱器具の近く　●高温になる場所
●吸・排気口をふさぐような場所

このような場所に置くと、ショートや発熱、電源コードの被膜が溶けるなどして、火災や感電、故障、変形の原因になることがあります。

禁 止

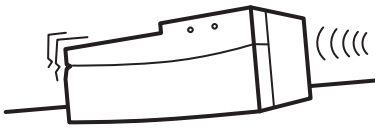
ぬれた手で電源プラグを抜き差しをしない



感電の原因になります。

水平

水平で丈夫な場所に設置する



プラグを持つ

電源プラグを持ってまっすぐ引き抜く

ななめに引き抜いたり、コードを持って抜くと、プラグの刃や芯線が破損してショート・感電・発火の原因になります。

⚠ 低温室で使用する場合の注意

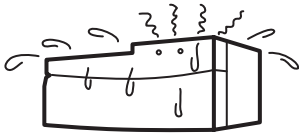
電源を
入れておく

装置を低温環境下でご使用になる場合、システム電源は常時入れておく

低温環境下で長時間システムの電源を落とした状態で放置すると、結露などにより故障の原因になります。
ランプなどの消耗品は OFF にしておくと、劣化を防ぐことができます。

電源を
入れない

装置を低温室から常温の場所に移動させる場合、常温に設置後、装置内の結露が無くなるまでシステム電源を入れない（状況により異なるが、通常半日から一昼夜）



感電・漏電火災の原因になります。

弊社製品についてのお問合せ　（バイオダイレクトライン）

TEL：03-5331-9336

受付時間 9：00 ～ 17：30
土・日・祝日、弊社指定休業日、年末年始を除く

www.gelifesciences.co.jp

e-mailで最新情報をお届けしています。お申込みは上記Webサイト右上の「メール会員登録」から。

© 2009 GE ヘルスケア バイオサイエンス株式会社　本書の全部または一部を無断で複写複製することは、著作権法上の例外を除き、禁じられています。
掲載されている製品は試験研究用以外には使用しないでください。掲載されている内容は予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。
掲載されている社名や製品名は、各社の商標または登録商標です。

GEヘルスケア バイオサイエンス株式会社

本 社　〒169-0073
東京都新宿区百人町3-25-1 サンケンビルヂング

お問合せ：バイオダイレクトライン
TEL : 03-5331-9336　FAX : 03-5331-9370
e-mail : Tech-JP@ge.com

ISO 9001:2000認証取得

取扱店